

---

**Patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre *Eurhizococcus colombianus* Jakubski  
(Hemiptera: Margarodidae), plaga de Mora  
(*Rubus glaucus* Benth.)**

YESICA PAOLA ARDILA RÍOS

Ingeniera Agrónoma

Tesis de Grado presentada como requisito parcial para optar el título en Magíster en Ciencias –  
Entomología

Director

JUAN HUMBERTO GUARÍN MOLINA

Ph.D. Entomología

Codirector

FRANCISCO CRISTÓBAL YEPES RODRÍGUEZ

I.A., M.Sc. Entomología

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MEDELLIN

FACULTAD DE CIENCIAS

2013

---

**Patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre *Eurhizococcus colombianus* Jakubski  
(Hemiptera: Margarodidae), plaga de Mora  
(*Rubus glaucus* Benth.)**

**YESICA PAOLA ARDILA RÍOS**  
Ingeniera Agrónoma

Aprobado por:

---

---

---

Fecha de aprobación

---

## **AGRADECIMIENTOS**

La autora expresa sus agradecimientos a:

La Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-CORPOICA, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural-MADR y la Asociación Hortifrutícola de Colombia-Asohofrucol por financiar este trabajo de investigación.

El equipo de trabajo de CORPOICA, C.I. La Selva: Claudia Jaramillo Mazo, Maria Isabel Aristizábal, Elizabeth Meneses y Ovidio Montoya.

Juan Humberto Guarín y Martha Londoño Zuluaga, por brindarme la oportunidad de hacer parte de este gran proyecto.

Francisco Cristóbal Yepes Rodríguez, Docente de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, por aportar a mi formación profesional.

Guillermo Correa, Docente de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, por la asesoría estadística.

---

## DEDICATORIA

Por y Para Van Gogh, la flor que siempre quise en mi jardín.

Para Jen, por estar a mi lado hoy y siempre, gracias por iluminar mi camino Habibi.

A mi familia por su apoyo incondicional, comprensión y todos los esfuerzos que hicieron para  
hacer de este trabajo una gratificante realidad.

A Stella de los Ríos por los Relatos de Poder.

A mis amigos de aquí y allá, por compartir su conocimiento, brindarme su cariño y enseñarme a  
vivir

A ti, siempre a ti. Maktub...

---

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE ANEXOS</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
<b>2. ESTADO DEL ARTE</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>4. HIPOTESIS</b>	<b>25</b>
<b>5. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>26</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>60</b>
<b>7. RECOMENDACIONES</b>	<b>61</b>
<b>8. LITERATURA CITADA</b>	<b>62</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>69</b>

---

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Características de los aislamientos comerciales de <i>P. lilacinus</i> y <i>M. anisopliae</i> .....	29
<b>Tabla 2.</b> Promedios estimados de Concentración y Germinación para los aislamientos nativos de <i>P. lilacinus</i> y <i>M. anisopliae</i> .....	34
<b>Tabla 3.</b> Promedios estimados de Concentración y Germinación para los aislamientos nativos de <i>P. lilacinus</i> y <i>M. anisopliae</i> .....	39
<b>Tabla 4.</b> Mortalidad acumulada (%) de ninfas de Perla de Tierra tratadas con aislamientos nativos de <i>P. lilacinus</i> a través del tiempo.....	41
<b>Tabla 5.</b> Mortalidad acumulada (%) de ninfas de Perla de Tierra tratadas con aislamientos comerciales de <i>P. lilacinus</i> .....	47
<b>Tabla 6.</b> Mortalidad acumulada (%) de ninfas de Perla de Tierra tratadas con aislamientos nativos de <i>M. anisopliae</i> .....	50
<b>Tabla 7.</b> Mortalidad acumulada (%) de ninfas de Perla de Tierra tratadas con aislamientos comerciales de <i>M. anisopliae</i> .....	54

---

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pag.</b>
<b>Figura 1.</b> Identificación macroscópica de los hongos <i>P. lilacinus</i> y <i>M. anisopliae</i> .....	36
<b>Figura 2.</b> Identificación microscópica de los hongos <i>P. lilacinus</i> y <i>M. anisopliae</i> .....	37
<b>Figura 3.</b> Crecimiento de aislamientos comerciales de <i>P. lilacinus</i> en medio de cultivo PDAAc y colonias de microorganismos contaminantes del genero <i>Penicillium</i> (derecha).....	38
<b>Figura 4.</b> Crecimiento de aislamientos comerciales de <i>M. anisopliae</i> en medio de cultivo PDAAc y colonias de microorganismos contaminantes del genero <i>Trichoderma</i> (derecha).....	39
<b>Figura 5.</b> Mortalidad de ninfas de <i>E. colombianus</i> ocasionada por ochos aislamientos nativos de <i>P. lilacinus</i> a través del tiempo.....	41
<b>Figura 6.</b> Signos de la enfermedad ocasionada por <i>P. lilacinus</i> en ninfas de <i>E. colombianus</i> .....	43
<b>Figura 7.</b> Efecto de aislamientos comerciales de <i>P. lilacinus</i> sobre la mortalidad de ninfas de <i>E. colombianus</i> que permanecen pegadas a la estaca de brevo a través del tiempo.....	44
<b>Figura 8.</b> Efecto de aislamientos comerciales de <i>P. lilacinus</i> sobre el desprendimiento de ninfas de <i>E. colombianus</i> de la estaca de brevo a través del tiempo.....	45
<b>Figura 9.</b> Efecto de aislamientos comerciales de <i>P. lilacinus</i> sobre la sobrevivencia de ninfas de <i>E. colombianus</i> pegadas a la estaca a través del tiempo.....	46
<b>Figura 10.</b> Mortalidad acumulada corregida de ninfas de <i>E. colombianus</i> ocasionada por aislamientos comerciales de <i>P. lilacinus</i> a través del tiempo.....	47
<b>Figura 11.</b> Síntomas y signos de la enfermedad ocasionada por aislamientos comerciales de <i>P. lilacinus</i> en ninfas de <i>E. colombianus</i> .....	48
<b>Figura 12.</b> Efecto de aislamientos nativos de <i>M. anisopliae</i> sobre la mortalidad de ninfas de <i>E. colombianus</i> pegadas a la estaca de brevo a través del tiempo.....	49
<b>Figura 13.</b> Mortalidad acumulada de ninfas de <i>E. colombianus</i> ocasionada por aislamientos nativos de <i>M. anisopliae</i> a través del tiempo.....	50

---

<b>Figura 14.</b> Efecto de aislamientos nativos de <i>M. anisopliae</i> sobre el desprendimiento de ninfas muertas de <i>E. colombianus</i> de la estaca de brevo a través del tiempo.....	51
<b>Figura 15.</b> Efecto de aislamientos nativos de <i>M. anisopliae</i> sobre la sobrevivencia de ninfas de <i>E. colombianus</i> pegadas a la estaca a través del tiempo.....	52
<b>Figura 16.</b> Síntomas y signos de la enfermedad ocasionada por aislamientos nativos de <i>M. anisopliae</i> en ninfas de <i>E. colombianus</i> .....	53
<b>Figura 17.</b> Efecto de aislamientos comerciales de <i>M. anisopliae</i> sobre la mortalidad de ninfas de <i>E. colombianus</i> pegadas a la estaca de brevo a través del tiempo.....	55
<b>Figura 18.</b> Mortalidad acumulada de ninfas de <i>E. colombianus</i> ocasionada por aislamientos comerciales de <i>M. anisopliae</i> a través del tiempo.....	55
<b>Figura 19.</b> Efecto de aislamientos comerciales de <i>M. anisopliae</i> sobre la sobrevivencia de ninfas de <i>E. colombianus</i> pegadas a la estaca de brevo a través del tiempo.....	56
<b>Figura 20.</b> Síntomas y signos de la enfermedad ocasionada por aislamientos comerciales de <i>M. anisopliae</i> en ninfas de <i>E. colombianus</i> .....	56
<b>Figura 21.</b> Concentración Letal Media (CL <sub>50</sub> ) para el aislamiento H066 de <i>P. lilacinus</i> .....	58
<b>Figura 22.</b> Tiempo Letal Medio (TL <sub>50</sub> ) para el aislamiento H066 de <i>P. lilacinus</i> a una Concentración de 10 <sup>8</sup> conidias/ml.....	58
<b>Figura 23.</b> Concentración Letal Media (CL <sub>50</sub> ) para el aislamiento A778 de <i>M. anisopliae</i> .....	59
<b>Figura 24.</b> Tiempo Letal Medio (TL <sub>50</sub> ) para el aislamiento A778 de <i>M. anisopliae</i> a una Concentración de 10 <sup>7</sup> conidias/ml.....	59



---

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
<b>Anexo 1.</b> Análisis de Varianza (ANOVA). Evaluación de patogenicidad de aislamientos nativos de <i>P. lilacinus</i> sobre ninfas de <i>E. colombianus</i> .....	70
<b>Anexo 2.</b> Análisis de Varianza (ANOVA). Evaluación de patogenicidad de aislamientos comerciales de <i>P. lilacinus</i> sobre ninfas de <i>E. colombianus</i> .....	77
<b>Anexo 3.</b> Análisis de Varianza (ANOVA). Evaluación de patogenicidad de aislamientos nativos de <i>M. anisopliae</i> sobre ninfas de <i>E. colombianus</i> .....	85
<b>Anexo 4.</b> Análisis de Varianza (ANOVA). Evaluación de patogenicidad de aislamientos comerciales de <i>M. anisopliae</i> sobre ninfas de <i>E. colombianus</i> .....	92
<b>Anexo 5.</b> Análisis Probit. Estimación de la Concentración Letal Media (CL <sub>50</sub> ) y Tiempo Letal Medio (TL <sub>50</sub> ) para el aislamiento H066 de <i>P. lilacinus</i> .....	100
<b>Anexo 6.</b> Análisis Probit. Estimación de la Concentración Letal Media (CL <sub>50</sub> ) y Tiempo Letal Medio (TL <sub>50</sub> ) para el aislamiento A778 de <i>M. anisopliae</i> .....	105

---

**Patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre *Eurhizococcus colombianus* Jakubski  
(Hemiptera: Margarodidae), plaga de Mora  
(*Rubus glaucus* Benth.)**

Yesica Paola Ardila Ríos<sup>1</sup>, Francisco Cristóbal Yepes Rodríguez<sup>2</sup>, Juan Humberto Guarín  
Molina<sup>3</sup>,

**RESUMEN**

*Eurhizococcus colombianus* o “perla de tierra Colombiana” es la especie insectil más reportada en Colombia en frutales de clima frío moderado, limitando su producción y constituyéndose en plaga clave del cultivo mora; donde el uso de hongos entomopatógenos se postula como una alternativa promisorio para su manejo. En este estudio se evaluó la patogenicidad de 25 aislamientos nativos y comerciales de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces lilacinus* en concentración de  $10^7$  conidias/ml sobre ninfas de primer instar de *E. colombianus*. El experimento fue conducido bajo un diseño estadístico completamente al azar (DCA) y las variables respuesta fueron: i) número de insectos muertos pegados al hospedero (PM), ii) número de insectos muertos despegados del hospedero (DM), iii) número de insectos vivos pegados al hospedero (PV), iv) número de insectos vivos despegados del hospedero (DV), v) mortalidad total (M %) y vi) registro de signos y síntomas causados por la acción del entomopatógeno. Se realizó Análisis de Medidas Repetidas en el Tiempo, prueba de comparación múltiple Tukey-HSD y Análisis Probit para estimar la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) y Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>) para los aislamientos más virulentos. El Análisis de Varianza (ANOVA) arrojó diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ) para las variables PM, PV y Mortalidad en todos los grupos evaluados, seleccionando los aislamientos H066 (*P. lilacinus*) y A778 (*M. anisopliae*) con mortalidad de 52.9% y 100% respectivamente, para determinar la CL<sub>50</sub> y TL<sub>50</sub>, debido a las diferencias altamente significativas que presentaron respecto al Testigo Absoluto (Tukey  $p < 0.0001$ ) durante la prueba de patogenicidad. La CL<sub>50</sub> para

---

<sup>1</sup> I.A. Candidata M.Sc. Entomología. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. ypardilar@unal.edu.co

<sup>2</sup> I.A., M.Sc. Entomología. Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. fcyepes@unal.edu.co

<sup>3</sup> I.A., PhD. Entomología. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-CORPOICA. Rionegro, Antioquia. jhguarin@gmail.com

---

H066 se estimó en  $10^8$  conidias/ml con  $TL_{50}$  de 23,2 días y para A778 la  $CL_{50}$  fue  $10^7$  conidias/ml con  $TL_{50}$  de 2,3 días ( $p < 0,0001$ ). Los principales síntomas asociados al proceso patogénico se relacionan con cambios en el color del integumento del insecto, pérdida de turgencia, pérdida de coordinación en los movimientos de desplazamiento y micosis invasiva con alta proliferación del micelio. Los resultados indican que el aislamiento *M. anisopliae* A778 es el más promisorio para la formulación de una estrategia de manejo de la Perla de Tierra Colombiana en sistemas productivos de Mora.

**Palabras Clave:** Entomopatógenos, Mortalidad, Virulencia, Ninfas

---

## ABSTRACT

*Eurhizococcus colombianus* or "Colombian ground pearl" is the most commonly reported insect pest species of moderately cold weather fruits in Colombia. It is known as a key pest of blackberry crop, because it is often associated with low production. Here, the use of entomopathogenic fungi is suggested as a promising alternative for its management. In this study we evaluated the pathogenicity of 25 commercial and native isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* in a concentration  $10^7$  conidia/ml on first-instar nymphs of *E. colombianus*. The experiment was conducted under a complete randomized design (CRD) and the response variables were: i) number of dead insects attached to the host plant (PM), ii) number of dead insects detached from the host plant (DM), iii) number of living insects attached to the host plant (PV), iv) number of living insects detached from the host plant (DV), v) total mortality (TM) and vi) signs and symptoms caused by the action of the entomopathogenic fungi. We performed Repeated Measures Analysis in Time, Multiple comparisons by Tukey-HSD and Probit Analysis to estimate the Median Lethal Concentration ( $LC_{50}$ ) and Median Lethal Time ( $LT_{50}$ ) for more virulent isolates. Analysis of Variance (ANOVA) showed significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ) for the variables PM, PV and Mortality in all groups of isolates evaluated, choosing the isolates H066 (*P. lilacinus*) and A778 (*M. anisopliae*) with a mortality of 52.9% and 100% respectively, for determinate the  $LC_{50}$  and  $LT_{50}$ , due to highly significant differences compared to Absolute Control (Tukey  $p < 0.0001$ ) during the pathogenicity test. The  $LC_{50}$  for *P. lilacinus* H066 was estimated at  $10^8$  conidia/ml with  $LT_{50}$  of 23.2 days and for *M. anisopliae* A778  $LC_{50}$  was  $10^7$  conidia/ml with  $LT_{50}$  of 2.3 days ( $p < 0.0001$ ). The main symptoms associated with pathogenic process involved changes in the color of the insect integument, turgor loss, coordination loss in the displacement and high proliferation of invasive fungal mycelia. According to these results it was determined that isolation *M. anisopliae* A778 is the most promising for the development of a management strategy for Colombian ground pearl in blackberry production systems.

**Keywords:** Entomopathogenic, Mortality, Virulence, Nymph

---

## 1. INTRODUCCIÓN

*Eurhizococcus colombianus* Jakubski (1965) (Hemiptera: Margarodidae) o “Perla de tierra colombiana”, es la principal plaga reportada en los sistemas de producción frutícolas de Colombia, incluido el cultivo de Mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) ocasionando pérdidas estimadas entre 10 y 15%, es decir, entre 1 y 2 ton/ha/año por debajo de la producción total nacional (12,5 ton/ha/año) para el año 2005 (ENA 2011). Las características morfológicas, etológicas y biológicas de este insecto, hacen difícil la implementación de estrategias de manejo efectivas que reduzcan la población y disminuyan los daños ocasionados sobre la planta.

Los insecticidas de síntesis química han sido los productos de mayor uso en diferentes programas fitosanitarios, que asociado a las críticas por el uso excesivo (alta frecuencia de aplicación, utilización de formulaciones altamente tóxicas y sobredosificación) y la alta demanda global de productos limpios libres de sustancias residuales que puedan afectar la salud humana, han derivado en la necesidad de promover la implementación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPAs) entre los agricultores, buscando así cumplir con los requerimientos de producción, calidad e inocuidad exigidos para su comercialización y exportación. Por tanto, la utilización de agentes de control biológico dentro de este sistema de manejo se convierte en una alternativa viable ya que ha sido implementada exitosamente para control de insectos plaga en otros cultivos, siendo los hongos entomopatógenos el grupo de microorganismos con mayor efectividad dado sus mecanismos y modos de acción únicos.

*Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces lilacinus* son dos especies de hongos Hypomycetes utilizados a nivel mundial con este propósito, obteniéndose niveles de control de hasta el 100% en otras especies de insectos. En Colombia se ha evaluado la patogenicidad de aislamientos nativos de estos dos hongos entomopatógenos sobre *E. colombianus* en diferentes estados de desarrollo sin diferenciar entre uno u otro, lo que hace pensar que el efecto puede ser mayor si se evalúa en ninfas de primer instar, ya que la capa lipídica que poseen los quistes y que provee una barrera de protección aun no ha sido formada durante este estado, haciéndolas más vulnerables al modo de acción de los Entomopatógenos (Lopera 2001; Carvajal 2002). En este sentido,

---

también se pueden presentar variaciones en la susceptibilidad de acuerdo al tipo de interacciones que se presentan a nivel del integumento con las estructuras del hongo.

La virulencia también representa un factor importante ya que determina el grado de patogenicidad de los aislamientos evaluados, de tal forma que aquellos que sean más virulentos presenten una Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) baja efectiva para el control de la plaga. Así, los aislamientos que son seleccionados exhiben mejor comportamiento en campo y presentan mayores porcentajes de mortalidad del insecto.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar la patogenicidad y virulencia de aislamientos de *M. anisopliae* y *P. lilacinus* sobre ninfas de *E. colombianus* con el propósito de seleccionar un aislamiento promisorio, determinar la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) y Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>) con el fin de contribuir a la formulación de una estrategia de manejo integrado de esta plaga en cultivos de mora.

---

## 2. ESTADO DEL ARTE

La mora es un frutal de amplia aceptación mundial cuya fruta es utilizada para jugos, concentrados mermeladas y saborizantes de la industria y la repostería. Los principales países productores de mora son Australia, Argentina, Canadá, España, Francia, Guatemala y Suiza. Para el año 2005, el área plantada a nivel mundial con este cultivo fue de 20.035 ha y tuvo un incremento del 45% desde el año 1995 con una producción de 154.644 toneladas (Strik et al. 2007). En el mercado internacional se vende principalmente para el procesamiento agroindustrial, con el propósito de acentuar sabores y aromas; en Colombia, la producción se destina al consumo doméstico para la preparación de jugos, jaleas y dulces (CCI 1999 y Tafur et al. 2006) y está dentro de los ganadores en la apuesta exportadora con la aprobación del Tratado de Libre Comercio con los Estados Unidos de América.

La mayor producción de Mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth.) se encuentran localizada en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Nariño, Risaralda, Santander, con un área total sembrada de 6.744 hectáreas aproximadamente, que representan una producción de 68.461 ton/año y un rendimiento de 12,5 ton/ha/año (ENA 2011). Sus mayores limitantes tecnológicos están en la baja disponibilidad de materiales seleccionados para satisfacer las exigencias del mercado y en la presión que hacen los insectos plaga y las enfermedades reduciendo la producción en los materiales cultivados actualmente. Entre los limitantes tecnológicos se encuentran los problemas fitosanitarios conocidos como Antracnosis, Moho Gris y Perla de Tierra Colombiana. El Moho Gris, causado por el hongo *Botrytis cinerea* afecta flores, pedúnculos, algunas veces hojas, pero sobre todo, pudrición de frutos, ocasionando pérdidas entre el 50-76% (Tamayo y Peláez 2000; Tamayo 2003).

La perla de tierra Colombiana, *Eurhizococcus colombianus* Jakubski (1965) (Hemiptera: Margarodidae), es la plaga más reportada en la cadena frutícola colombiana, causando reducción del 10 al 15% (1-2 ton/ha/año) de la producción en cultivos de mora (Castrillón et al. 2000a; Carvajal 2002) y afectando negativamente la calidad de la fruta. En plantas con síntomas severos de ataque (muerte de la planta), se ha encontrado poblaciones con generaciones superpuestas, concentrada en la raíz principal y hacia el cuello de la planta en cantidades abundantes de quistes

---

adheridos unos con otros o sueltos; adicionalmente el sistema de raíces secundarias y terciarias desaparece, lo que impide que la planta se alimente (Castrillón et al. 2000b).

A pesar de ser un insecto plaga de importancia, en Colombia no se ha realizado muchos estudios orientados a desarrollar y formular nuevas estrategias de manejo, siendo relevante mejorar el conocimiento sobre su biología y ecología con el propósito de reducir su impacto negativo sobre el cultivo.

### 2.1. *Eurhizococcus colombianus* Jakubski

La perla de tierra Colombiana, *Eurhizococcus colombianus* Jakubski (1965) (Hemiptera: Margarodidae), es un plaga polífaga que coloniza las raíces de muchos cultivos (mora, brevo, vid, pasto, aguacate, feijoa, manzano, durazno y tomate entre otros) y muchas especies de malezas pertenecientes al género *Rumex* (Quiñones et al. 2008; Kondo y Gomez 2008). El primer registro de la presencia de este insecto en Colombia fue realizado por Figueroa (1946) en raíces de *Arracacia xanthorrhiza* (Kondo 2001; Kondo y Gomez 2008; Guarín y Carvajal 2002). La especie fue originalmente identificada incorrectamente como *Eurhizococcus brasiliensis* Hempel (1922) y posteriormente fue descrita como una nueva especie, *E. colombianus* por Jakubski (Kondo y Gomez 2008; Quiñones et al. 2008).

Pertenece a la superfamilia Coccoidea, comúnmente denominados “insectos escama”, ya que producen una cubierta que utilizan para cubrir su cuerpo; la familia Margarodidae Cockerell *sensu stricto*, o perlas de tierra de amplia distribución mundial con solo dos subfamilias Neotropicales: Margarodidinae Jakubski (1965) y Termitococcinae Jakubski (1965) (Foldi 2005). Esta última, a su vez se constituye por las tribus Termitococcini (*Termitococcus aster* Silvestri, 1901 y *T. carratoii* Silvestri, 1936) y Eurhizococcini (*E. brasiliensis* Hempel, 1922, *E. brevicornis* Silvestri, 1901 y *E. colombianus*) (Campos 2010; Foldi 2005; Gullan y Cook 2007).

Los trabajos realizados por Kondo y Gómez (2008) y Campos (2010) han contribuido enormemente a esclarecer la morfología y taxonomía de este insecto. Kondo y Gómez (2008) señalan que las claves taxonómicas a nivel genérico de Foldi (2005) no concuerdan



---

completamente con los caracteres de *E. colombianus*, ya que esta especie, contrario a las otras pertenecientes al género, presenta una placa anal esclerosada no conspicua, situación que ha dado lugar a confusiones en su determinación taxonómica. Actualmente solo existe un carácter diagnóstico en hembras adultas para diferenciar las especies *E. colombianus* y *E. brasiliensis*, separándolas por el número de artejos antenales con la siguiente clave:

1. Antena hembra adulta con 6 segmentos.....*E. colombianus* Jakubski

1'. Antena hembra adulta con 5 segmentos.....*E. brasiliensis* Wille

Campos (2010) propuso un carácter diagnóstico adicional para ninfas de primer instar con base en el número de artejos antenales y la posición de las cicatrices metatorácicas:

1. Antena con 2 artejos, un par de cicatrices metatorácicas formando un eje paralelo en relación a las patas metatorácicas..... *E. colombianus* Jakubski

1'.Antena uníarticulada.....2

2. Un par de cicatrices metatorácicas formando un eje perpendicular en relación a las patas metatorácicas..... *E. brevicornis* Silvestri

2'. Dos pares de cicatrices metatorácicas formando un eje perpendicular en relación a las patas metatorácicas..... *E. brasiliensis* Wille

Este insecto se caracteriza por presentar desarrollo hemimetábolo, habito críptico o subterráneo, reproducción partenogenética facultativa tipo telitoquia (Delgado 2006; Castrillón et al. 2000a) con ciclo de vida que pasa por los estados de: a) huevo, los cuales pueden ser depositados en forma de cadena o en interior de una capsula protectora u ovisaco; b) ninfa móvil de forma globular, sin vestigios de segmentación, amplia distribución de setas en la región dorsal y ventral de la parte final del abdomen, piezas bucales grandes, fuertes y bien desarrolladas con el labio dividido en dos artejos no diferenciados y antenas en forma de maza con dos segmentos

---

diferenciados; c) quiste o cisto, de tamaño variable, sugiriendo esto la presencia de más de un estado ninfal durante la etapa de cisto; y finalmente d) hembra adulta, que se desarrolla dentro del cisto del último estado ninfal (Lopera 2001; Kondo y Gomez 2008).

De acuerdo a estudios realizados por Londoño et al. (2010), el ciclo de vida de *E. colombianus* bajo condiciones de laboratorio tiene una duración promedio de 211,87  $\pm$  17,72 días, evaluado sobre dos hospederos: i) brevo y ii) remolacha (estacas), logrando obtener un máximo de 1,7 generaciones por año. Estos datos difieren de los estudios realizados por Castrillón et al. (2000b), donde obtuvieron un ciclo de vida de 26  $\pm$  2 meses bajo condiciones de invernadero evaluando cuatro hospederos: mora (*R. glaucus*), tomate de árbol (*Solanum betaceum*), lengua de vaca (*Rumex crispus*) y envidia (*Rumex acetocella*).

Su distribución en la rizósfera se concentra en el primer estrato del suelo a profundidades entre 0 y 30 cm, especialmente en la base de la planta (Delgado 2006), considerándose perjudicial el estado ninfal, puesto que los adultos están desprovistos de aparato bucal como en *E. brasiliensis* (Botton y Colleta 2010). En el caso de *E. brasiliensis*, la sintomatología observada en el hospedero se asocia a un marchitamiento progresivo de la planta afectada por la succión continua de savia (Teixeira et al. 2002; Botton y Colleta 2010) y la inyección adicional de enzimas digestivas y toxinas que degradan el tejido vegetal interesado (Soria y Galloti 1986), sin embargo no existen evidencias que detallen el modo de acción de estas sustancias en el hospedero ni la respuesta del mismo. Para *E. colombianus* las plantas con síntomas severos de ataque las poblaciones (principalmente quistes) se concentran en el cuello de la planta y la raíz principal, ocasionado la desaparición del sistema de raíces secundarias y terciarias, lo que impide que la planta se alimente (Castrillón et al. 2000a).

---

## 2.2. Estrategias de Manejo

En busca de soluciones para el problema que representan estos insectos plaga, algunos investigadores han conducido experimentos evaluando la eficacia de algunos principios químicos activos para reducir las poblaciones de estos insectos, p.ej., Soria y Galloti (1986) en un estudio para controlar a *E. brasiliensis*. Sin embargo, las medidas de control para reducir el daño de estas plagas son difíciles de implementar.

En el caso de *E. brasiliensis*, los métodos convencionales de control químico, como los insecticidas de contacto clorados, carbamatos y fosforados líquidos y en formulación granulada, muestran como máximo índice de control 60%, lo que no es suficiente para evitar los daños ocasionados en las plantas (Teixeira et al. 2002). Teixeira et al. (2002) y Botton et al. (2010), evaluaron el efecto de la aplicación de los insecticidas Neonicotinoides, Imidacoprid y Thiamethoxam, sobre quistes de la perla de tierra de Brasil, *E. brasiliensis*, observando una reducción de la población de hasta el 90% de quistes en viñedos establecidos.

En Colombia, para el control de perla de tierra colombiana, 50% de los productores utilizan Furdán al suelo en dosis de 20 a 60 gr/planta con frecuencia variable de 1, 3 y 12 meses o no realizan ningún tipo de control (Castrillón et al. 2000a); aunque, el compuesto más efectivo para el manejo de *E. colombianus* es Metidathion, causando mortalidad del 83,3% de insectos después de cinco meses de la aplicación, según citación de Quiñones et al. (2008). Sin embargo, las exigencias de inocuidad del producto, los riesgos que representa para la salud humana la aplicación de insecticidas, la posible residualidad de los productos en las frutas y en los componentes ambientales, así como el incremento del 15% en los costos de producción (Castrillón et al. 2000a), hacen inviables la continuación de estas estrategias de manejo de *E. colombianus* en este cultivo y otros hospederos.

Por otro lado, el control biológico es una práctica agrícola en constante crecimiento que busca la eliminación total o parcial de patógenos e insectos plaga, frecuentemente mediante el uso de sus enemigos naturales, resultando una alternativa eficiente al uso de insecticidas químicos, considerados altamente nocivos para la salud del hombre y los ecosistemas (Téllez-Jurado et al.

---

2009). Existen numerosos reportes sobre la utilización de microorganismos entomopatógenos (Castrillo et al. 2005; Molina et al. 2007; Leemon y Jonsson 2008; Driesche et al. 2010) que dada su capacidad de producir enfermedad y muerte en insectos, son utilizados como agentes de control biológico (Téllez-Jurado et al. 2009).

### 2.3. **Hongos Entomopatógenos**

Los hongos entomopatógenos son enemigos naturales de diversos artrópodos y son reguladores importantes en ecosistemas terrestres (Driesche et al., 2010; Meyling et al. 2009); han sido reportados como endoparásitos y ectoparásitos ocasionando morbilidad y mortalidad de manera espontánea (Williams 2003). Biológicamente, este grupo de microorganismos difieren de otros grupos de patógenos de insectos por su habilidad y mecanismos para invadir al hospedero atravesando de forma directa la cutícula o la pared del tracto digestivo (Castrillo et al. 2005; Téllez-Jurado et al. 2009), constituyéndose así como el mayor grupo de bioagentes para el control de plagas (Ahmad y Ahmad 2010).

Su ciclo de vida y reproducción generalmente asexual, comprende las siguientes fases: i) adhesión y germinación de la espora sobre la cutícula del insecto, ii) penetración al hemocelo y iii) desarrollo del hongo, que generalmente resulta en la muerte del hospedero y iv) dispersión de las conidias mediante procesos activos o pasivos (Tanada y Kaya, 1993). Cada uno de estos pasos está influenciado por un rango de factores externos e integralmente intrínsecos, los cuales determinan la patogenicidad y virulencia de los mismos. Es así como el agua, iones, ácidos grasos y nutrientes que se encuentran sobre la superficie de la cutícula, influyen en la germinación de conidias y su comportamiento; llegando a sincronizar su ciclo de vida con los estados de desarrollo del insecto hospedero bajo condiciones ambientales favorables (Shahid, et al. 2012) ocasionando epizootias dramáticas que conducen a un rápido decline de las poblaciones (Pell et al. 2010).

Pell et al. (2010) señalaron factores importantes a tener en cuenta para formular estrategias de manejo de cultivos como: i) Ambiente abiótico, ii) Composición del suelo, iii) Aplicación de pesticidas y iv) Quema de residuos de cultivo; donde la modificación de ciertas prácticas de

---

manejo puede beneficiar la proliferación de los hongos, además de mejorar las redes alimenticias existentes y la interacción con otros enemigos naturales dentro de ellas, de tal forma que permitan la agregación del hospedero y permitan su interacción en diferentes niveles tróficos (Meyling y Hajek 2010; Roy et al. 2010).

Algunos autores determinaron que la interacción de los hongos con el suelo puede beneficiar su dispersión (Vega et al. 2009; Roy et al. 2010; Pell et al. 2010), ya que muchos de ellos dependen de este, al ser un reservorio ambiental en el cual pueden persistir además de llevar a cabo su ciclo de vida incluyendo la multiplicación en el hospedero y también, potencialmente, crecer de manera saprofítica en ausencia del mismo (Pell et al. 2010). De la misma forma, otros factores abióticos que afectan el desarrollo de los hongos como la radiación solar y la temperatura, pueden ser reguladas a través del suelo, el cual ofrece oportunidades y ventajas al brindar protección y actuar como un buffer en contra de condiciones de temperaturas extremas (Vega et al. 2009).

Adicionalmente, existe una relación entre la patogenicidad ocasionada y el grupo taxonómico. Especies pertenecientes a los Hypocreales son considerados generalmente como patógenos oportunistas que infectan varias especies en un rango amplio de ordenes de insectos, donde la muerte del hospedero esta comúnmente asociada con la producción de toxinas, las cuales superan la respuesta defensiva del mismo; en contraste, la infección y muerte ocasionada por hongos Entomophthorales, tiende a ocurrir debido a la colonización del tejido con poco o nada de uso de toxinas (Pell et al. 2010).

Aunque ambos grupos son importantes dentro de las estrategias de control biológico, la alta asociación de los Hypocreales con hospederos que permanecen algo o mucho de su tiempo en el suelo, donde estos hongos son ubicuos (Pell et al. 2010; Williams 2003; Roy et al. 2010), además de ser ampliamente reportados como micoinsecticidas exitosos con más de 150 productos para el biocontrol (Jackson et al. 2010; Gardezi 2006), destacando las especies *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin y *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson por su alta diversidad genética (Inglis et al. 2008; Devi et al. 2006; Inglis y Tigano 2006).

---

### 2.3.1. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin

*Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883 (Deuteromycotina: Hyphomycetes) es un hongo de exclusiva reproducción asexual (Inglis et al. 2008) que en condiciones naturales, ha sido descrito como "muscardina verde" en más de 200 especies de insectos (Padilla-Melo et al. 2000; Leemon y Jonsson 2008), exhibiendo diferentes grados de especificidad, la cual está influenciada por las características del patógeno y de la cutícula del hospedante. Durante la patogénesis, *M. anisopliae* tiene la capacidad de sintetizar enzimas extracelulares que pueden degradar polímeros de la cutícula (proteínas, lípidos y quitina), permitiendo el aprovechamiento de nutrimentos para su crecimiento (Padilla-Melo et al. 2000) y en el caso de las destruxinas (Dtxs-depsipéptidos cíclicos), representan factores importantes de virulencia que aceleran la muerte de los insectos (Liu y Tzeng 2012).

Dentro de esta familia de toxinas, las Dtxs A, B y E son altamente predominantes y de acuerdo a estudios realizados por Wang et al. (2004) sobre las cepas V245 y V275 de *M. anisopliae* la producción de estas depende del sustrato disponible, siendo particularmente importante la cantidad de peptona y glucosa en el medio de cultivo; y el tiempo de inoculación, correlacionando una alta producción de Dtrx A con la Dtrx B durante los primeros días de crecimiento (día seis) hasta alcanzar un nivel de estabilización a los nueve días de incubación con valores similares para los tres destruxinas evaluadas.

Así mismo, factores abióticos como la temperatura determinan otras características de este hongo, como la producción y viabilidad de conidias, inicio de germinación, crecimiento hifal, entre otras, encontrando que temperaturas por encima de 28°C favorece su desarrollo y promueven una mayor producción de conidias (Liu et al. 2003).

Respecto al potencial como agente de biocontrol, evaluaciones de patogenicidad realizadas bajo condiciones de laboratorio han vislumbrado el alto potencial de esta especie como microorganismo entomopatógeno. Rodríguez et al. (2006) evaluaron 64 aislamientos de *M. anisopliae* var. *anisopliae* y 70 de *B. bassiana* a una concentración de  $10^7$  conidias/ml en huevos de la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), obteniendo mortalidad entre el

---

80% y 60% respectivamente. Estudios realizados en especies del orden Hemiptera, como *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae), la chinche subterránea de la yuca, mostraron resultados positivos en la aplicación de *M. anisopliae* en ninfas de quinto instar, observándose un alto potencial patogénico de los aislamientos evaluados ocasionando mortalidad hasta del 70% de los individuos (Sánchez y Belloti 1997). Igualmente, cinco aislamientos de este mismo hongo evaluados a una concentración de  $10^7$  conidias/ml, ocasionaron mortalidad de hasta el 97%, sobre ninfas de cuarto instar de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (Herrera et al. 1999).

### 2.3.2. *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson

*Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson, 1974 (Deuteromycotina: Hyphomycetes) es un hongo filamentoso habitante del suelo que ha sido reportado reduciendo la densidad poblacional de nematodos parásitos de plantas, animales y afectando humanos (Schenck 2004; Gortori et al. 2008) y es considerado como uno de los agentes de biocontrol más promisorios para el manejo de huevos de nematodos fitoparásitos como *Meloidogyne* spp. (Park et al. 2004; Ahmad y Ahmad 2010; Wang et al. 2010). EL-Shanshoury et al. (2005) determinaron el potencial de *P. lilacinus* como biocontrolador de larvas de *Meloidogyne incognita*, obteniéndose con ellos mortalidad entre 95,4% y 98,9%.

Gortori et al. (2008), evaluaron la actividad enzimática de este entomopatógeno en medios de cultivo líquidos y sólidos con quitina y la patogenicidad sobre huevos de *Toxocara canis*, parásito de perros causante de la enfermedad toxocarosis, determinando a los 14 días de crecimiento, en medio de cultivo líquido, alta actividad de proteolasas y quitinasas, sugiriendo que estas enzimas se encuentran asociadas a la penetración de la cubierta de los huevos de nematodos ocasionando cambios en la estructura de esta en combinación con mecanismos físicos de penetración. Respecto a la patogenicidad de los dos aislamientos evaluados, obtuvieron una mortalidad de 65,6%. Para el caso de insectos, Nunes et al. (2010) reportaron altos niveles de patogenicidad de este hongo sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), ocasionando 100% de mortalidad 15 días después de la aplicación.

---

Este hongo entomopatógeno presenta una alta actividad enzimática, especialmente producción de quitinas, proteasas y lipasas, que están altamente relacionadas con su patogenicidad. Por otro lado, se ha determinado la producción de leucinostatinas o paecilotoxinas, (nonapéptidos) como un factor importante de virulencia (Hajek y Leger 1994; Park et al. 2004).

### 2.3.3. Uso de hongos entomopatógenos para el control de *E. colombianus*

Tanto *M. anisopliae* como *P. lilacinus* han sido evaluados sobre *E. colombianus*. Lopera (2001) evaluó la patogenicidad de aislamientos de *M. anisopliae* sobre la perla de tierra colombiana obteniendo mortalidad máxima del 25% con uno de los aislamientos probados y sin observar ningún tipo de infección en los quistes. Por otra parte, aislamientos de *Paecilomyces* sp. fueron evaluados sobre quistes de *E. colombianus*, obteniéndose mortalidad muy baja a los 30 días de aplicación de los tratamientos, presentándose solo un aislamiento que produjo mortalidad del 70% a los 42 días, utilizando una concentración de  $10^7$  conidias/ml (Carvajal 2002). Sin embargo, estos hongos representan una alternativa de manejo altamente promisorio en estados juveniles del insecto, ya que la capa lipídica que poseen los quistes y que provee una barrera de protección aun no ha sido formada durante los estados de huevo y ninfa (Quiñones et al. 2008), haciéndolos más vulnerables al modo de acción de los entomopatógenos. Adicionalmente existen estructuras a nivel morfológico donde posiblemente ocurren interacciones que se presentan a nivel del integumento del insecto con el hongo que podrían contribuir al aumento de la susceptibilidad a sustancias detergentes que asociadas a la posterior aplicación de estos entomopatógenos, potencializarían su patogenicidad (datos no publicados).

Dados los anteriores antecedentes y las evaluaciones de patogenicidad previamente realizadas en Colombia para *E. colombianus*, el siguiente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la patogenicidad de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces lilacinus* sobre ninfas de *E. colombianus* con el fin de contribuir a la implementación de una estrategia de manejo integrado de esta plaga en cultivos de mora, determinando la  $CL_{50}$  para los aislamientos seleccionados.



---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo General

- Evaluar la patogenicidad de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces lilacinus* sobre *Eurhizococcus colombianus*, con el fin de contribuir al desarrollo de una estrategia de manejo integrado de esta plaga en cultivos de Mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth.).

#### 3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la patogenicidad de aislamientos nativos y comerciales de *M. anisopliae* sobre ninfas de *E. colombianus*.
- Evaluar la patogenicidad de aislamientos nativos y comerciales de *P. lilacinus* sobre ninfas de *E. colombianus*.
- Determinar la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) para los aislamientos de *M. anisopliae* y *P. lilacinus* con la mayor virulencia sobre ninfas de *E. colombianus*.

### 4. HIPOTESIS

#### Hipótesis I. *Metarhizium anisopliae*

H<sub>A</sub>: Alguno de los aislamientos de *M. anisopliae* presenta actividad patogénica sobre ninfas de *E. colombianus*.

#### Hipótesis II. *Paecilomyces lilacinus*

H<sub>A</sub>: Alguno de los aislamientos de *P. lilacinus* presenta actividad patogénica sobre ninfas de *E. colombianus*.

#### Hipótesis III.

H<sub>A</sub>: Al menos uno de los aislamientos de *M. anisopliae* y *P. lilacinus* es más virulento.

---

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Localización

El trabajo se realizó en el Centro de Investigación “La Selva” de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, ubicado en la vereda Llanogrande del municipio de Rionegro (Antioquia) con coordenadas 06°07'59,3" N, 75°25'7,8"O. La temperatura promedio es de 17°C, precipitación media anual de 2100 mm y humedad relativa del 78%. De acuerdo a la clasificación de las zonas de vida de Holdridge (1996), la formación vegetal del área de trabajo es bosque húmedo montano bajo (bh-MB).

La fase de reactivación, aislamiento de hongos entomopatógenos, pruebas de pureza, germinación y producción de hongos se realizaron en el Laboratorio de Entomología y los bioensayos se montaron en el área de cría de *E. colombianus*.

### 6.2. Cría de *E. colombianus*

De acuerdo a los protocolos de CORPOICA IN-R-499 (Corpoica 2009a) y IN-R-500 (Corpoica 2009b), se hicieron recolecciones y procesamiento de muestras de insectos para cría. Se recogieron muestras de ovisacos de perla de tierra *E. colombianus* en árboles de jazmín (*Jasminum sambac* (L.) Aiton) y siguiendo las medidas de protección fueron transportados a los laboratorios de Corpoica La Selva, para la selección y descarte de ovisacos dañados durante el transporte. Los ovisacos seleccionados se llevaron al cuarto de cría, se envasaron individualmente en recipientes plásticos con suelo solarizado y se ubicaron en un BIOTRON (modelo 046) bajo condiciones de penumbra (de 0:24 h luz) y temperatura promedio de 22°C. Para los bioensayos se tomaron ninfas de siete días de edad, justo después de la eclosión del ovisaco y se ubicaron en una estaca de brevo instalada e inmovilizada en una espuma floral, a su vez colocada en bandeja plástica, donde se realizó la aplicación de los respectivos tratamientos, es decir, los aislamientos de los dos hongos entomopatógenos evaluados.

---

### 6.3. Reactivación de aislamientos nativos de *M. anisopliae* y *P. lilacinus*

Los aislamientos nativos de *M. anisopliae* y *P. lilacinus* fueron obtenidos a partir de insectos de *E. colombianus* que exhibieran síntomas y signos ocasionados por los dos entomopatógenos y a partir de aislamientos almacenados en condiciones de refrigeración, a temperatura promedio de 4°C en papel filtro (conidias). Los procedimientos para la reactivación de los hongos se hizo de acuerdo a la metodología propuesta por Vélez et al. (1997) en el laboratorio de Entomología de CORPOICA La Selva. La primera fase de reactivación consistió en inocular el hongo sobre ninfas de *E. colombianus*. Se tomaron muestras de los hongos almacenados en la unidad de refrigeración del laboratorio de Entomología y se hicieron repiques en medios de cultivos Papa Dextrosa Agar y Sabouraud Dextrosa Agar acidificados (PDAac y SDAac) en cámara de flujo laminar a partir de la fuente de inóculo seleccionada (conidias). Posterior a la reactivación en medio de cultivo se realizaron reactivaciones de los hongos sobre ninfas de *E. colombianus* con el fin de aumentar el potencial enzimático y determinar la factibilidad de infección sobre el insecto, para ello se tomaron diez ninfas previamente desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% y lavadas con Agua Destilada Estéril (ADE), se sumergieron durante dos minutos en 10 ml de la solución del aislamiento con una concentración de  $10^7$  conidias/ml; posteriormente se llevaron a cámara húmeda durante 15 días, tiempo en el cual se debe presentar el desarrollo de estructuras del hongo en el insecto (micelio, conidióforos y conidias). Los hongos aislados se identificaron macro y microscópicamente mediante montaje en placas con coloración específica (Azul de lactofenol) para la identificación taxonómica.

Los aislamientos reactivados exitosamente sobre el insecto fueron sembrados en un sustrato vegetal en botellas de vidrio con 60 gr de arroz previamente esterilizado (autoclave 15 lb presión durante 15 minutos). Para tal fin, se tomó 5 ml de la suspensión madre obtenida a partir del cultivo en medio sólido PDAac (caja petri 100 x 15 mm) con el propósito de conseguir la concentración de conidias requerida para las evaluaciones de patogenicidad ( $10^7$  conidias/ml). Se incubaron a 23°C de temperatura promedio y fotoperiodo 24:0 h luz durante 15 días.

Para determinar la calidad de los aislamientos exitosamente reactivados se hicieron evaluaciones de calidad: germinación de conidias efectiva 24 horas después de la inoculación en medio de

---

cultivo (%) y pureza (%); tomando como referencia importante la cantidad de microorganismos contaminantes o sustancias inertes que disminuyan la eficiencia del hongo de interés (Papierok y Hajek 1997; Vélez et al. 1997).

Para la prueba de germinación se define una conidia germinada como aquella que produce un tubo germinativo más grande que el diámetro de la espora, considerándose esto como una germinación adecuada. El procedimiento consistió en inocular alícuotas de 5µl en cajas de petri con 10ml de Agar- Agar. Se marcó la cara posterior externa de las cajas petri con cinco puntos correspondientes a los lugares donde se depositaron las alícuotas; posteriormente, se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente, tiempo después del cual se adicionó una gota de azul de lactofenol con el fin de suspender el proceso de germinación y teñir las conidias. Se realizaron observaciones al microscopio para determinar la germinación y se totalizaron las conidias germinadas y no germinadas; expresando los resultados en porcentaje de conidias germinadas. Esto se realizó con el fin de establecer que la mortalidad ocasionada por estos hongos en los bioensayos sobre *E. colombianus* se debe al entomopatógenos sobre el insecto y no a factores bióticos y abióticos externos.

Para determinar la concentración se tomó una botella de arroz para cada aislamiento y se preparó una suspensión madre con ADE y Tween 80 al 0,1% hasta conseguir un volumen de 500 ml; a partir de esta suspensión se tomó 1ml y se diluyó en un tubo con 9 ml de ADE y se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una dilución de  $10^{-4}$ . Para realizar el recuento de conidias se utilizó una cámara de Neubauer, contando el número de conidias presentes en los 25 cuadrantes centrales de la cámara, haciendo un total de seis lecturas por cada muestra (10µl por muestra) y promediando los resultados. La concentración se obtuvo multiplicando el promedio del número de conidias por el inverso de la dilución empleada para el conteo ( $10^4$ ) y por el inverso del factor de la cámara ( $10^4$ ).

#### 6.4. Aislamientos comerciales de *M. anisopliae* y *P. lilacinus*

Los aislamientos comerciales utilizados para las pruebas de patogenicidad se obtuvieron de empresas colombianas productoras de entomopatógenos. Se preparó la solución madre de cada producto a partir de 10 gr/producto comercial en 200 ml de ADE; asimismo se hicieron pruebas de germinación, pureza, y concentración de conidias para determinar la calidad de los entomopatógenos de acuerdo a la metodología propuesta por Vélez et al. (1997) anteriormente descrita y se compararon los resultados con las especificaciones técnicas proporcionadas por el fabricante (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características de los aislamientos comerciales de *P. lilacinus* y *M. anisopliae*.

	Aislamiento comercial	Microorganismo	Concentración (conidias/g)	Cantidad pc* (g/200 ml)	Vol. Aplicación (ml)
1	BIOSTAT (Laverlam)	<i>P. lilacinus</i>	$2 \times 10^7$	10	10
2	LILACINOL (Biocontrol)	<i>P. lilacinus</i>	$1 \times 10^8$	10	10
3	SAFELOMYCES (Safer)	<i>P. lilacinus</i>	$1 \times 10^8$	10	10
4	BIOMYCES (Biotropical)	<i>P. lilacinus</i>	$2 \times 10^9$	10	10
5	NEMOCROP (Bio-Crop)	<i>P. lilacinus</i>	$2 \times 10^8$	10	10
6	<i>P. lilacinus</i> (Bioprotección)	<i>P. lilacinus</i>	$1 \times 10^{10}$	10	10
7	PAECILOTRÓPICO (SMT)	<i>P. lilacinus</i>	$1 \times 10^9$	10	10
8	<i>M. anisopliae</i> (Bioprotección)	<i>M. anisopliae</i>	$1 \times 10^{10}$	10	10
9	BIO-RHIZIUM-C (Biotropical)	<i>M. anisopliae</i>	$3,5 \times 10^8$	10	10
10	METABIOL (Biocontrol)	<i>M. anisopliae</i>	$1 \times 10^8$	10	10
11	METATROPICO (SMT)	<i>M. anisopliae</i>	$1 \times 10^9$	10	10

\*pc= producto comercial

Para la prueba de pureza, se prepararon cajas Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA) más cloranfenicol al 0,016% y se tomaron de los tubos de la dilución  $10^{-4}$  submuestras del patrón agitando en vortex durante un minuto y se inocularon 0,1 ml en la superficie las cajas, dispersando el inóculo con la ayuda de un rastrillo bacteriológico; se llevaron a incubación a una

---

temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  con el fin de promover el desarrollo de unidades formadoras de colonia (UFC) y 24 horas después se inicio el conteo diario del número de UFC de cada organismo presente durante 7 días, en todas las submuestras. Al final de las lecturas, se identificaron cada uno de los microorganismos presentes con el fin de estimar el porcentaje del entomopatógeno en estudio, otros hongos, bacterias y levaduras encontrados; esto con la finalidad de establecer la proporción del agente biológico en la formulación e identificar los posibles microorganismos contaminantes (Vélez et al. 1997).

### **6.5. Pruebas de patogenicidad sobre *E. colombianus***

Se evaluaron 25 aislamientos de los hongos entomopatógenos de las especies *M. anisopliae* y *P. lilacinus*, incluyendo formulados comerciales a una concentración de  $10^7$  conidias/ml. Se realizaron cuatro pruebas de patogenicidad evaluando grupos de aislamientos así: i) ocho aislamientos nativos de *P. lilacinus* ii) siete aislamientos comerciales de *P. lilacinus* iii) seis aislamientos nativos de *M. anisopliae*, y iv) cuatro aislamientos comerciales de *M. anisopliae*; usando una estructura unifactorial de los tratamientos y un esquema de aleatorización completamente al azar con tres repeticiones. La unidad experimental consistió de tres bandejas plásticas cada una con una estaca de brevo dispuesta sobre una espuma floral estéril, en la cual se ubicaron un total de diez ninfas por estaca/bandeja, para un total de 30 ninfas por unidad experimental. Se realizó una única aplicación de 10 cc de ADE al inicio del bioensayo y se asperjaron 10 cc de la solución del aislamiento (tratamiento) evaluado sobre los individuos dispuestos previamente en la estaca. El testigo absoluto contó con una unidad experimental de las mismas características, donde solo se realizó una única aplicación de 10 cc de ADE en la espuma floral. Las variables a medir fueron: i) número de insectos muertos pegados al hospedero (PM), ii) número de insectos muertos despegados del hospedero (DM), iii) número de insectos vivos pegados al hospedero (PV), iv) número de insectos vivos despegados del hospedero (DV), y Mortalidad Total (M %). Dichas mediciones se hicieron una vez por semana, durante las cinco semanas siguientes a la aplicación del tratamiento. Adicionalmente se hicieron observaciones de los signos y síntomas en el insecto (integumento, color, forma, etc.) presencia de signos del entomopatógeno.

---

Para determinar cuáles fueron los aislamientos más patogénicos se tomaron los siguientes criterios de selección: a) resultado del análisis estadístico, b) procedencia del aislamiento (insecto a partir del cual se obtuvo); y de acuerdo a la metodología propuesta por Fernández et al. (2003) tres criterios restantes: c) Número de insectos muertos, d) Número de insectos con signos de afección propios del tratamiento y e) Días a mortalidad del 50% de la población en prueba. Además de procedencia del aislamiento.

### **6.7. Determinación de la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>)**

Para los aislamientos seleccionados se calculó la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) evaluando cinco concentraciones seriadas: 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> conidias/ml y 100 ninfas por tratamiento (concentración). La unidad experimental consistió de diez bandejas plásticas cada una con una estaca de brevo dispuesta sobre una espuma floral estéril, en la cual se ubicaron un total de diez ninfas por estaca/bandeja, para un total de 100 ninfas por unidad experimental. Se realizó una única aplicación de 10 cc de ADE al inicio del bioensayo y se asperjaron 10 cc de la solución de la concentración (tratamiento) sobre los individuos dispuestos previamente en la estaca. El testigo absoluto conto con una unidad experimental de las mismas características, donde solo se realizó una única aplicación de 10 cc de ADE en la espuma floral. Las variables a medir fueron: número de ninfas muertas, número de perlas vivas y mortalidad total (%).

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SAS versión 9.1., y las graficas fueron elaboradas en el programa Statgraphic Centurion XV.I.

### **6.8. Análisis estadístico**

Para las pruebas de patogenicidad el diseño estadístico fue completamente al azar (DCA) con tres repeticiones por tratamiento, donde cada tratamiento correspondió a uno de los aislamientos evaluados de *P. lilacinus* y *M. anisopliae*. Se hicieron análisis de medidas repetidas en el tiempo para cada grupo de datos y prueba de Tukey para comparaciones de medias entre tratamientos; para verificar que los datos siguiesen una distribución normal se hizo prueba de Normalidad Shapiro-Wilk.

---

Para el cálculo de Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) los datos de mortalidad fueron corregidos con los datos de mortalidad del tratamiento testigo mediante la fórmula de Abbott (1925) y fueron procesados por análisis Probit (Throne, 1995).

$$MC = \frac{MTTO - MT \times 100}{100 - MT \times 100}$$

MC: Mortalidad Corregida (%)

MTTO: Mortalidad Tratamiento (%)

MT: Mortalidad Testigo (%)

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SAS versión 9.1., y las graficas de CL<sub>50</sub> se realizaron en Statgraphic Centurion XV.I.



---

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Reactivación de aislamientos nativos de *M. anisopliae* y *P. lilacinus*

Fueron aislados y reactivados ocho aislamientos nativos de *P. lilacinus* y seis de *M. anisopliae* a partir de muestras almacenadas en la unidad de refrigeración de Corpoica (condiciones de criopreservación a 4°C) y muestras de *E. colombianus* colectadas en localidades del Oriente Antioqueño.

Los aislamientos nativos seleccionados fueron: H065, H066, H067, H068, H069, H070, H071, H072 para *P. lilacinus* y H014, H044, A762, A778, A884 y A898 para *M. anisopliae*. En la Tabla 2 se relaciona la concentración (conidias/ml) y germinación (%) para cada aislamiento.

Todos los aislamientos *P. lilacinus* presentaron concentraciones de  $10^8$  conidias/ml y germinación por encima del 85% 24 horas después de la inoculación en medio de cultivo Agar-Agar; por el contrario, los aislamientos del género *M. anisopliae* no exhibieron una germinación adecuada en el mismo tiempo de evaluación a pesar de mostrar una concentración de conidias mayor respecto a *P. lilacinus* ( $10^9$  conidias/ml).

**Tabla 2.** Promedios estimados de Concentración y Germinación para los aislamientos nativos de *P. lilacinus* y *M. anisopliae*.

<b>Código Aislamiento</b>	<b>Hongo Entomopatógeno</b>	<b>Hospedero (procedencia)</b>	<b>Concentración (conidias/ml)</b>	<b>Germinación (%)</b>
H065	<i>P. lilacinus</i>	Blattodea (epifamilia Termitoidae)	$2.8 \times 10^8$	95,7
H066	<i>P. lilacinus</i>	Hemiptera	$2,0 \times 10^8$	99,2
H067	<i>P. lilacinus</i>	Coleoptera	$3,5 \times 10^8$	97,2
H068	<i>P. lilacinus</i>	Coleoptera	$4,8 \times 10^8$	86,9
H069	<i>P. lilacinus</i>	Coleoptera	$5,3 \times 10^8$	93,4
H070	<i>P. lilacinus</i>	Coleoptera	$5,1 \times 10^8$	96,1
H071	<i>P. lilacinus</i>	Coleoptera	$3,6 \times 10^8$	93,3
H072	<i>P. lilacinus</i>	Coleoptera	$9,0 \times 10^8$	94,3
H014	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	$1,0 \times 10^9$	45,3
H044	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	$4,8 \times 10^9$	43,2
A762	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	$1.7 \times 10^9$	53,4
A778	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	$2,5 \times 10^9$	65,5
A884	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	$1,0 \times 10^9$	97,0
A898	<i>M. anisopliae</i>	Hemiptera	$3,2 \times 10^9$	63,0

Los aislamientos que presentaron menor tasa de germinación fueron H014 y H044 con un 45,3 y 43,2% respectivamente 24 horas después de la inoculación en medio Agar-Agar. El registro de esta baja germinación posiblemente se debe a que este medio de cultivo no proporciona la relación Carbono-Nitrogeno (C:N), los contenidos de peptonas y proteínas que puedan beneficiar la rápida ocurrencia de este proceso biológico (Shah et al. 2005) y su papel consiste simplemente en mantener la humedad por un tiempo más o menos prolongado, dada la importancia de este factor para el desarrollo de los hongos; de tal forma que cuando ésta comienza a disminuir, la formación de micelio también disminuye y el hongo tiene que asegurar su perpetuidad formando estructuras propagativas (esporas, conidias) (Cañedo y Ames 2004). Así mismo, aportar quitina del insecto al medio de cultivo mejora la expresión del hongo, aumentando su tasa de germinación y crecimiento, además de promover la producción de transcriptos patogénicos relacionados con cepas más virulentas.

---

Adicionalmente, la influencia de otros factores ambientales como temperatura y Concentración de O<sub>2</sub> pueden afectar la germinación. Faria et al. (2010) observaron que conidias de *M. anisopliae* requieren un tiempo mayor a 24 horas para la germinación y solo 42% y 20% de las conidias permanecen viables después de una rehidratación rápida a temperaturas de 34 y 25°C respectivamente. Estudios realizados por Ibrahim et al. (1999) muestran resultados similares, obteniendo bajas tasas de germinación de conidias en mezcla con aceites vegetales y extracto de insecto en medio de cultivo SDA, que ligadas a variaciones en la actividad acuosa del medio, produjo la reducción drástica de la germinación, pasando de 94% a 0% en un periodo de evaluación de 24 horas. Ibrahim et al. (2002) observo el mismo comportamiento para tres cepas de *M. anisopliae* hallando porcentajes de germinación muy bajos 48 horas después de la inoculación en diferentes medios de cultivo con variaciones en la fuente de carbono, registrando el valor más bajo para la cepa V234 con un 16% de conidias germinadas trascurrido este periodo.

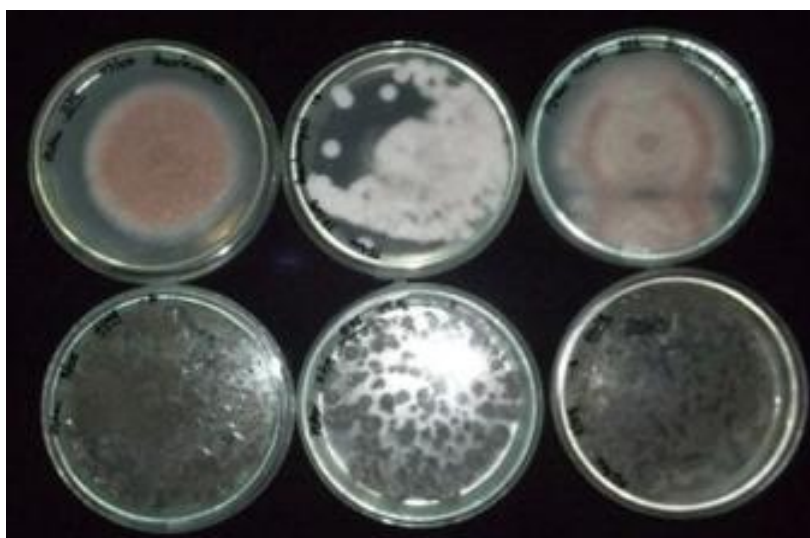
En relación con este último aspecto, es posible que durante la rehidratación de conidias al ser inmersas en el medio de cultivo, presenten una rápida inhibición ocasionada por daños en la membrana plasmática (Faria et al. 2009), lo que supone una mayor labilidad de las conidias de esta especie a factores bióticos y abióticos. Xavier-Santos et al. (1999) encontraron una germinación promedio de 80% 25 horas después de la inoculación y temperatura de incubación de 28°C para *M. flavoviride*, un porcentaje de germinación que está por debajo del parámetro exigido para control de calidad (>85%) (Vélez et al. 1997). Bastidas et al. (2009) al evaluar la germinación de cinco preformulados y un cultivo de conidias puro del hongo entomopatógeno *B. bassiana* hallaron que cultivos de conidias puras presentaban inicialmente una reducción drástica en el porcentaje de germinación (<80%) incluso 30 horas después de la inoculación.

Por otro lado, los aislamientos A762, A778, A898 y A884 presentaron porcentajes de germinación por encima del 50%, siendo el aislamiento 884 el que mostró un mejor comportamiento con un 97% de germinación 24 horas después de la inoculación.

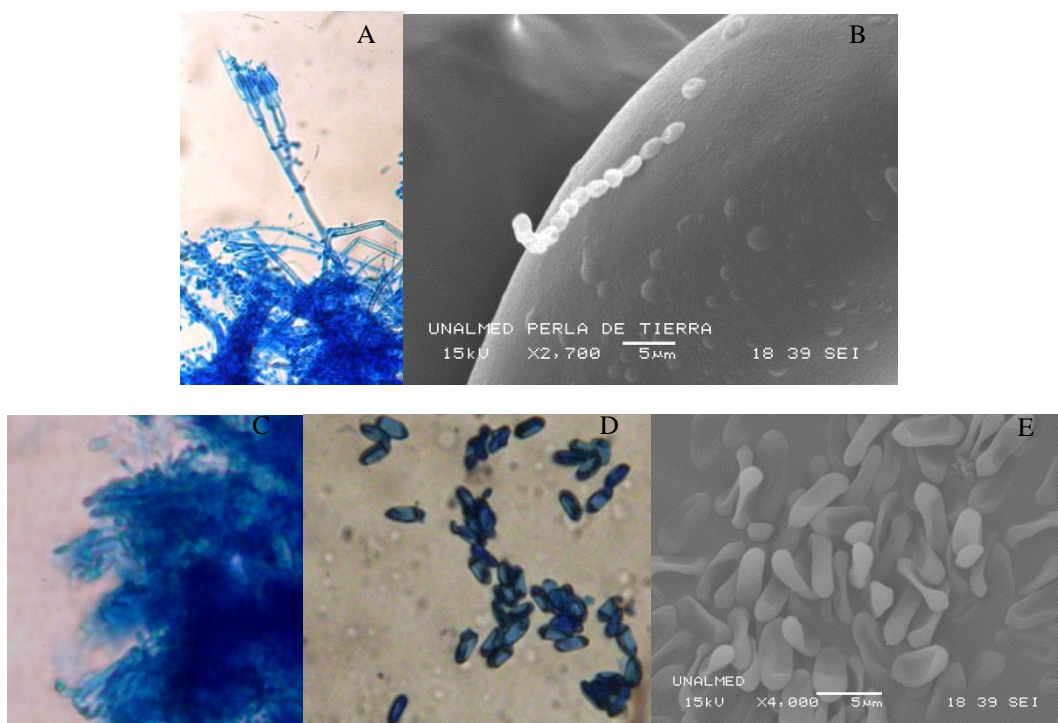
En cuanto a las características macroscópicas de *P. lilacinus*, el aspecto de las colonias fue algodonoso con pigmentación de blanca a lila y abundante esporulación en medio PDAac, variando la pigmentación de un aislamiento a otro (Fig. 1); al microscopio se observaron

---

conidióforos en fiálide con conidias redondas ligeramente ovaladas hacia los extremos (Fig. 2). En relación a *M. anisopliae* se observaron colonias algodonosas con poca elevación y pigmentación que pasó de blanco a amarillo y posteriormente verde oliváceo durante la esporulación en el mismo medio de cultivo (Fig. 1); al microscopio se observan conidióforo en fiálide y conidias alargadas (Fig. 2).



**Figura 1. Identificación macroscópica de los hongos *P. lilacinus* y *M. anisopliae*.** Formación y desarrollo de colonias de *P. lilacinus* (línea superior) y *M. anisopliae* (línea inferior) en medio de cultivo PDAac, ocho días después de la inoculación.



**Figura 2. Identificación microscópica de los hongos *P. lilacinus* y *M. anisopliae*.** A) Célula conidiógena (Conidióforo) de *P. lilacinus*; B) Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) de conidias de *P. lilacinus*; C) Célula conidiógena (Conidióforo) de *M. anisopliae*; D) Conidias de *M. anisopliae*; E) Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) de conidias de *M. anisopliae*.

## 5.2. Aislamientos comerciales de *M. anisopliae* y *P. lilacinus*

Se encontró para los aislamientos comerciales de *P. lilacinus* concentraciones de  $10^9$  conidias/g (Lilacinol®),  $10^{10}$  conidias/g (Safelomyces®, Biomyces®, Paecilomyces®, Nemocrop® y Paecilotropico®) y  $10^{11}$  conidias/g (Biostat®). La germinación varió entre los diferentes aislamientos, siendo Biomyces y Lilacinol los que presentaron tasas más bajas con promedios de 13,6% y 33,3% respectivamente. Así mismo se observa en estos dos aislamientos los resultados más bajos en la prueba de pureza, donde se hallaron colonias contaminantes de hongos *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. (Fig. 3). Los demás aislamientos presentaron germinación y pureza por encima del 80% (Tabla 3), además de obtener concentraciones por encima de los valores registrados por el fabricante.



**Figura 3.** Crecimiento de aislamientos comerciales de *P. lilacinus* en medio de cultivo PDAac y colonias de microorganismos contaminantes del género *Penicillium* (Derecha, colonia verdosa en la parte superior).

Los aislamientos comerciales de *M. anisopliae* presentaron un comportamiento similar con concentración promedio de  $10^{10}$  conidias/g, que comparados con la concentración registrada en la etiqueta del producto son superiores en todos los lotes evaluados. Sin embargo, la germinación estuvo por debajo del 80%, una tasa baja para formulaciones comerciales, la cual debe ser superior al 85% trascurridas 24 horas después de la inoculación, debido a que el hongo cuando es asperjado en campo debe tener un rápido efecto sobre la población del insecto que está atacando y un corto período de exposición a condiciones ambientales adversas (Vélez et al. 1997).

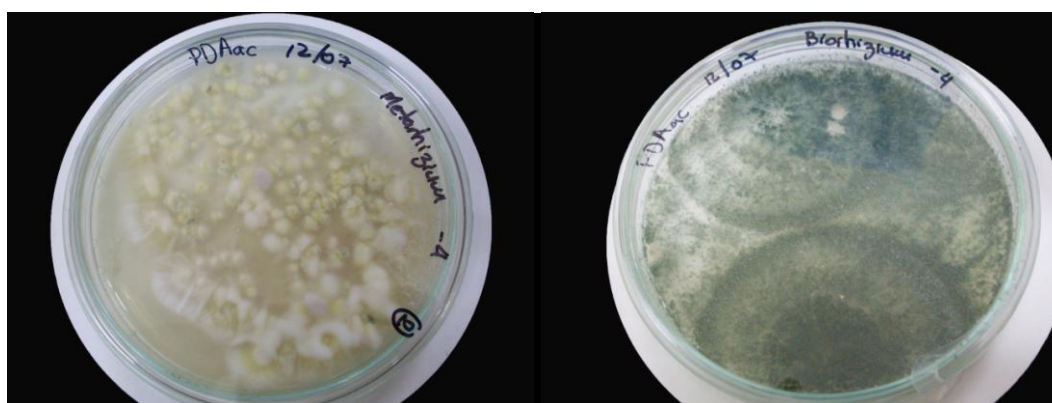
Aunque varios autores señalan que a través de una formulación se mejora la estabilidad y la vida de almacenamiento de las conidias (Alves et al. 1996; Bastidas et al. 2009), otros señalan que también pueden perder viabilidad durante el proceso de producción y almacenamiento, por tanto, es posible que esto afecte la velocidad de germinación (Faria et al. 2009; Jackson et al. 2010). Así mismo, aquellos aislamientos o cepas más virulentas tienden a germinar rápidamente (Xavier-Santos et al. 1999); lo que presume una mayor eficiencia en el comportamiento patogénico de estos aislamientos sobre *E. colombianus*.

**Tabla 3.** Promedios estimados de Concentración y Germinación para los aislamientos nativos de *P. lilacinus* y *M. anisopliae*.

Producto comercial	Microorganismo	Concentración (conidias/g)	Germinación (%)	Pureza (%)
BIOSTAT (Laverlam)	<i>P. lilacinus</i>	7,7 X 10 <sup>11</sup>	78,9	100,0
LILACINOL (Biocontrol)	<i>P. lilacinus</i>	6,6 X 10 <sup>9</sup>	33,3	70,0
SAFELOMYCES (Safer)	<i>P. lilacinus</i>	9,5 X 10 <sup>10</sup>	87,2	99,0
BIOMYCES (Biotropical)	<i>P. lilacinus</i>	5,6 X 10 <sup>10</sup>	13,6	89,0
NEMOCROP (Bio-Crop)	<i>P. lilacinus</i>	3,6 X 10 <sup>10</sup>	96,0	100,0
<i>P. lilacinus</i> (Bioprotección)	<i>P. lilacinus</i>	1,2 X 10 <sup>10</sup>	98,6	98,8
PAECILOTROPICO (SMT)	<i>P. lilacinus</i>	4,8 X 10 <sup>10</sup>	87,2	100,0
<i>M. anisopliae</i> (Bioprotección)	<i>M. anisopliae</i>	2,8 X 10 <sup>10</sup>	71,9	99,4
BIO-RHIZIUM-C (Biotropical)	<i>M. anisopliae</i>	1,6 X 10 <sup>10</sup>	72,9	50,0
METABIOL (Biocontrol)	<i>M. anisopliae</i>	4,6 X 10 <sup>10</sup>	79,2	100,0
METATROPICO (SMT)	<i>M. anisopliae</i>	1,6 X 10 <sup>10</sup>	77,1	90,0

\*Pruebas realizadas con 1g pc/100 ml ADE

Adicionalmente en el producto BioRhizium-C® se obtuvo una pureza del 50%, con presencia del genero *Trichoderma* como microorganismo contaminante. Los demás aislamientos presentaron pureza por encima del 90% (Fig. 4).



**Figura 4.** Crecimiento de aislamientos comerciales de *M. anisopliae* en medio de cultivo PDAac y colonias de microorganismos contaminantes del género *Trichoderma* (Derecha).

---

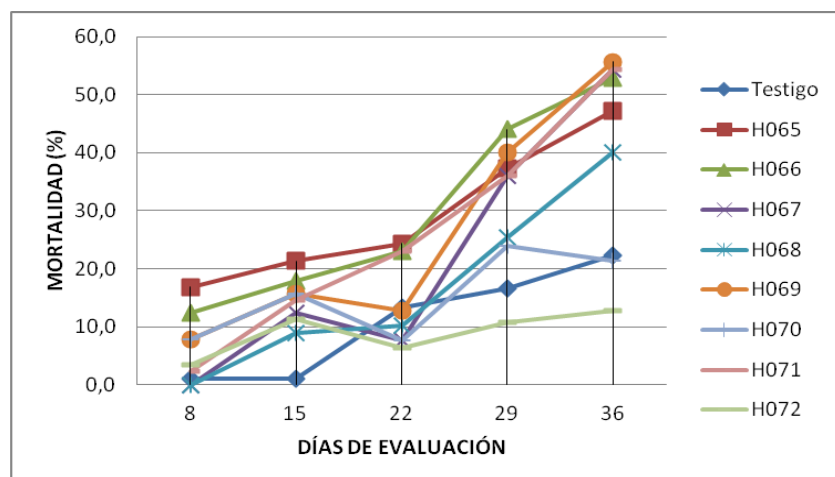
### 5.3. Patogenicidad sobre *E. colombianus*

#### 5.3.1. Evaluación de la patogenicidad causada por aislamientos nativos de *P. lilacinus* sobre ninfas de *E. colombianus*

Se evaluaron ocho aislamientos de *P. lilacinus* obtenidos en la fase de reactivación que corresponden a los códigos H065, H066, H067, H068, H069, H070, H071 y H072 respecto a un testigo absoluto, para un total de nueve tratamientos. El Análisis de Varianza (ANOVA) arrojó diferencias significativas entre los tratamientos evaluados para las variables PM y Mortalidad total (%), mientras que las variables PV, DM y DV no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,097$ ,  $p=0,9011$  y  $p=0,8271$ , respectivamente) (Anexo 1).

La variable PM y Mortalidad Total (M%) fueron estadísticamente significativas ( $p<0,0342$  y  $p<0,0349$  respectivamente), lo que se interpreta de acuerdo a la Hipótesis alternativa como la presencia de actividad patogénica de por lo menos uno de los aislamientos evaluados sobre ninfas de *E. colombianus*. Adicionalmente no se observó desprendimiento de ninfas fuera del área de aplicación, es decir, la estaca de brevo, lo que sugiere que no existe un efecto disuasor durante la epizootia que cambie la conducta alimentaria del insecto. En la figura 5, se observa la tendencia general a través del tiempo de la mortalidad ocasionada por los ocho aislamientos evaluados respecto a la baja mortalidad que se presenta en el tratamiento testigo.





**Figura 5.** Mortalidad acumulada de ninfas de *E. colombianus* ocasionada por ocho aislamientos nativos de *P. lilacinus*.

El Análisis de comparación de medias mínimas significativas ajustada a la prueba de Tukey muestra diferencias entre los tratamientos H065, H066, H067, H069 y H071 y el Testigo Absoluto, sin embargo no existen diferencias entre ellos. Para estos aislamientos se observó una mayor mortalidad cinco semanas después de la aplicación, con mortalidad acumulada corregida del 47,1; 52,9; 54,3, 55,7% y 54,3% respectivamente (Tabla 4).

**Tabla 4.** Mortalidad acumulada (%) de ninfas de *E. colombianus* tratadas con aislamientos nativos de *P. lilacinus* a través del tiempo.

TRATAMIENTO	DIAS DESPUES DE INOCULACIÓN (DDI)				
	8	15	22	29	36
1 Testigo Absoluto	1,1	1,1	13,3	16,7	22,2 b
2 H065	16,9	21,3	24,4	37,3	47,1*a
3 H066	12,4	18,0	23,1	44,0	52,9*a
4 H067	0,0	12,4	7,7	36,0	54,3*a
5 H068	0,0	9,0	10,3	25,3	40,0 b
6 H069	7,9	15,7	12,8	40,0	55,7*a
7 H070	7,9	15,7	7,7	24,0	21,4 b
8 H071	2,2	14,6	23,1	36,0	54,3*a
9 H072	3,4	11,2	6,4	10,7	12,9 c

\*Tratamientos estadísticamente significativos. Prueba Tukey para comparación múltiple de medias ( $\alpha = 0,05$ )

---

El aislamiento H069 ocasionó una mortalidad del 55,7% sin embargo no presentó diferencias significativas con el tratamiento H066 36 DDI ( $p=1.000$ ) en ninguno de los tiempos de evaluación, de acuerdo a la prueba Tukey de diferencias mínimas significativas. Teniendo en cuenta el criterio de selección relacionado con la procedencia del aislamiento, se escogió el aislamiento H066 debido a que es el único que fue aislado a partir de quistes de *E. colombianus*.

Adicionalmente, estudios previos realizados por Carvajal (2002), donde evalúan la patogenicidad de este aislamiento, muestran resultados similares respecto a la actividad patogénica de este hongo sobre *E. colombianus*, registrando una mortalidad de 66.67% 42 DDI sobre quistes de perla de tierra colombiana. Cabe mencionar que dos de los aislamientos evaluados en el presente estudio, H065 y H066, corresponden a los aislamientos evaluados por este autor, quien los nombra para su trabajo como U de A y Piñera respectivamente.



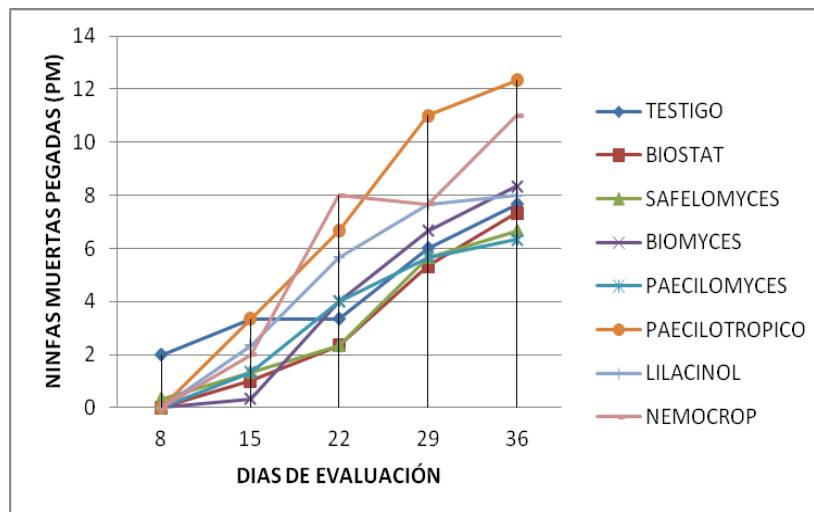
**Figura 6.** Signos de la enfermedad ocasionada por *P. lilacinus* en ninfas de *E. colombianus*.

Los principales síntomas asociados a la invasión del hongo en el cuerpo del insecto se relacionan con cambios en el color del integumento de blanco a amarillo, pérdida de turgencia y posterior desarrollo de estructuras del hongo por fuera del cuerpo del insecto. El desarrollo de una micosis lila es el principal signo de la presencia del hongo, dándose una amplia proliferación de micelio y desarrollo de estructuras reproductivas (conidióforos). Estos síntomas y signos se observan claramente en la figura 6.

### 5.3.2. Evaluación de la patogenicidad causada por aislamientos comerciales de *P. lilacinus* sobre ninfas de *E. colombianus*

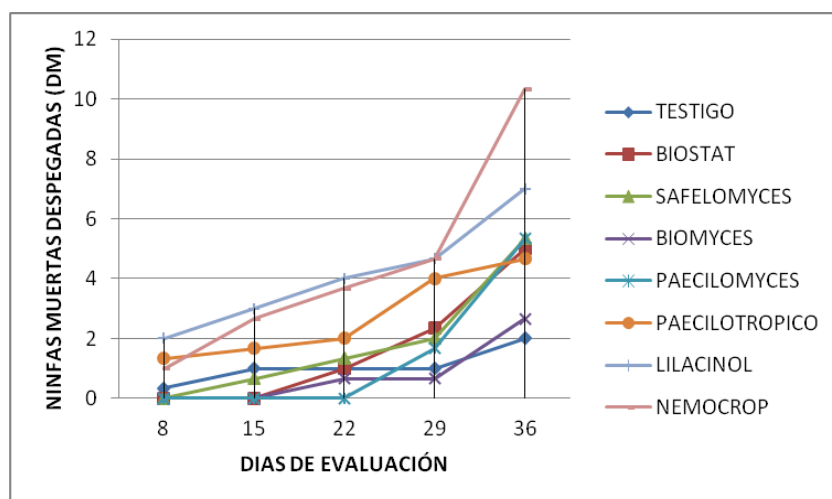
Se evaluaron siete aislamientos comerciales de *P. lilacinus*: Biomyces®, Safelomyces®, Biostat®, *Paecilomyces* (Bioprotección), Paecilotropico®, Lilacinol® y Nemocrop®, respecto a un testigo absoluto, para un total de ocho tratamientos. De acuerdo al Análisis de Varianza (ANOVA) se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las variables PM, DM, PV y Mortalidad Total (%), mientras que la variable DV no fue estadísticamente significativa ( $p=0,6090$ ).

La variable PM mostró diferencias significativas ( $p=0,0358$ ), aceptándose así la hipótesis alternativa, es decir, al menos uno de los aislamientos comerciales evaluados tiene un efecto sobre la muerte de ninfas que se encuentran pegadas a la estaca de brevo. Aunque se presentaron diferencias significativas para los tiempos evaluados y la interacción del tiempo con los tratamientos ( $p<0,0001$  y  $p=0,0469$ , respectivamente), la prueba Tukey para comparación múltiple de medias no arrojó diferencias entre los tratamientos ( $p>0,05$ ) (Anexo 2.1.). En la figura 7 se observa el comportamiento de la variable a través del tiempo.



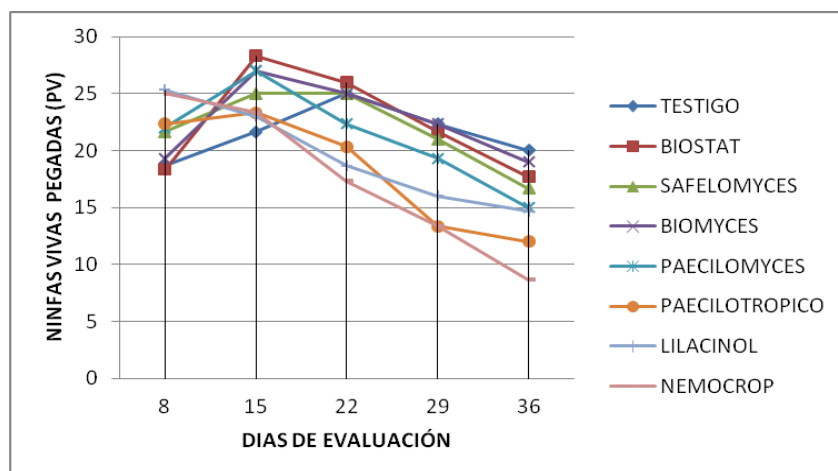
**Figura 7.** Efecto a través del tiempo de aislamientos comerciales de *P. lilacinus* sobre la mortalidad de ninfas de *E. colombianus* que permanecen pegadas a la estaca de brevo.

Se concluye que el hongo entomopatógeno tiene un efecto sobre el desprendimiento de ninfas de la estaca de brevo (DM) ( $p=0,0074$ ) como respuesta del proceso patogénico en el insecto y el desarrollo de micosis invasiva ( $p<0,0001$  y  $p=0,0399$ , respectivamente) (Fig. 8 y Anexo 11.2.2.); sin embargo, la prueba de comparación múltiple de medias Tukey, mostró que no hay diferencias entre los aislamientos evaluados ( $p>0,05$ ) y solo el producto Nemocrop® fue levemente superior respecto al testigo (Anexo 2.2.), presumiéndose que el desprendimiento de ninfas obedece al cese de actividades motoras y de alimentación por acción del entomopatógeno y el desarrollo de la epizootia en las ninfas infectadas y que no existe una diferencia en la virulencia entre los aislamientos.



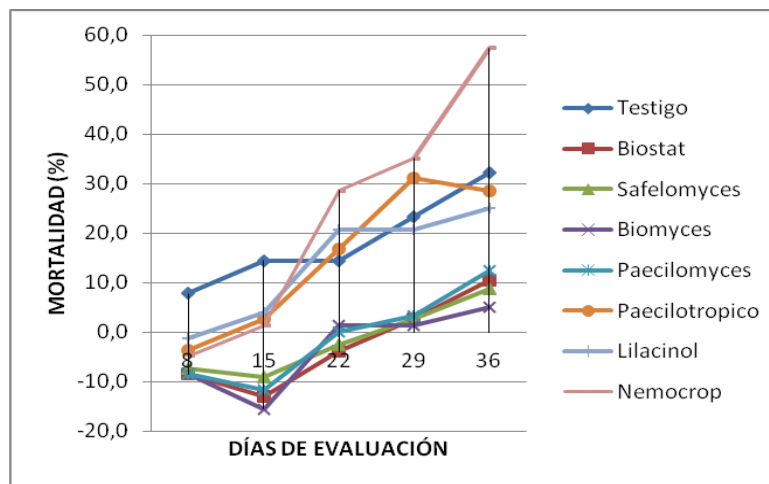
**Figura 8.** Efecto a través del tiempo de aislamientos comerciales de *P. lilacinus* sobre el desprendimiento de ninfas de *E. colombianus* de la estaca de brevo.

En la figura 9 se observa el comportamiento de la variable PV, estadísticamente significativa ( $p=0,0311$ ). Esta, al igual que en las variables anteriores, no mostró diferencias significativas para la interacción entre los tratamientos ( $p>0,05$ ) (Anexo 2.3.), debido a que la fue notablemente baja durante la evaluación, observando alta tasa de supervivencia de ninfas sanas que continuaron alimentándose, lograron así producir los exudados necesarios para la formación de la capa lipídica y pasar al estado de quiste.



**Figura 9.** Efecto a través del tiempo de aislamientos comerciales de *P. lilacinus* sobre la supervivencia de ninfas de *E. colombianus* pegadas a la estaca.

En general, la mortalidad de ninfas (M %), fue evidente ocho días después de la aplicación ( $p=0.0349$ ), aumentando progresivamente a través del tiempo en todos los tratamientos ( $p<0,0001$  para el tiempo y  $p=0.0025$  para la interacción), con tasas por encima del 50% 36 DDI para los productos Paecilotropico® y Nemocrop®. Este último, mostro diferencias significativas respecto a Biostat® ( $p=0,0275$ ), Safelomyces® ( $p=0,0378$ ), Biomyces® ( $p=0,0217$ ) y Paecilomyces® ( $p=0,0275$ ) a partir de los 22 DDI (Anexo 2.5.), sin embargo no se presentaron diferencias con el testigo, tratamiento en el cual la mortalidad fue elevada y estuvo por encima de la mitad respecto a Nemocrop® 36 DDI (Fig. 10). La respuesta de ninfas de *E. colombianus* al efecto de la aplicación de aislamientos comerciales de *P. lilacinus* se aprecia en la Tabla 5.



**Figura 10.** Mortalidad acumulada corregida de ninfas de *E. colombianus* ocasionada por aislamientos comerciales de *P. lilacinus*.

**Tabla 5.** Mortalidad acumulada (%) de ninfas de *E. colombianus* tratadas con aislamientos comerciales de *P. lilacinus*.

TRATAMIENTO	DIAS DESPUES DE INOCULACIÓN (DDI)				
	8	15	22	29	36
1 Testigo Absoluto	7,8	14,4	14,4	23,3	32,2
2 Biostat®	-8,4	-13,0	-3,9	2,6	10,4
3 Safelomyces®	-7,2	-9,1	-2,6	2,6	8,7
4 Biomyces®	-8,4	-15,6	1,3	1,3	5,1
5 Paecilomyces®	-8,4	-11,7	0,0	3,2	12,5
6 Paecilotropico®	-3,6	2,6	16,9	31,2	28,6*
7 Lilacinol®	-1,2	3,9	20,8	20,8	25,0
8 Nemocrop®	-4,8	1,3	28,6	35,1	57,4*

\*Tratamientos estadísticamente significativos. Prueba Tukey para comparación múltiple de medias ( $\alpha=0,05$ )

El desprendimiento de ninfas vivas de la estaca (DV) no fue estadísticamente significativo ( $p=0,6090$ ), resultado asociado con el encontrado para la variable DM, lo que permite afirmar que las ninfas que no fueron afectadas por el hongo entomopatógeno y lograron prenderse de la estaca para alimentarse y se mantuvieron allí hasta alcanzar el desarrollo del siguiente instar ninfal o quiste, donde la acción del hongo se ve drásticamente reducida.

---

Aunque Nemocrop presentó una mortalidad acumulada de 57,4% y fue estadísticamente significativo respecto a otros aislamientos comerciales, no se observaron micosis invasivas ni signos del hongo en todas las ninfas muertas halladas (prendidas y desprendidas de la estaca). Esto sumado a la alta tasa de mortalidad de ninfas en el tratamiento testigo y baja virulencia de los aislamientos evaluados no permite seleccionar ninguno de ellos como promisorio para el control de *E. colombianus*.

Los principales síntomas asociados a la invasión de los aislamientos comerciales de *P. lilacinus* fueron cambios en el color del integumento de blanco a amarillo o lila, pérdida de turgencia y posterior desarrollo de estructuras del hongo por fuera del cuerpo del insecto. El desarrollo de una micosis vario de blanco a lila y fue el principal signo de la presencia del hongo, dándose una amplia proliferación de micelio (Fig. 11).



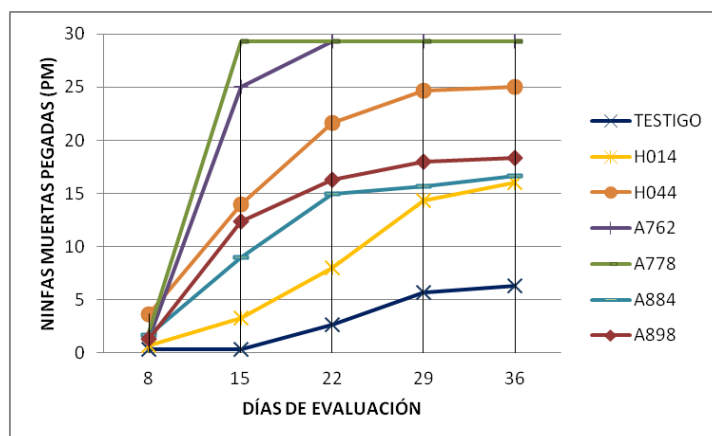
**Figura 11.** Síntomas y signos de la enfermedad ocasionada por aislamientos comerciales de *P. lilacinus* en ninfas de *E. colombianus*.



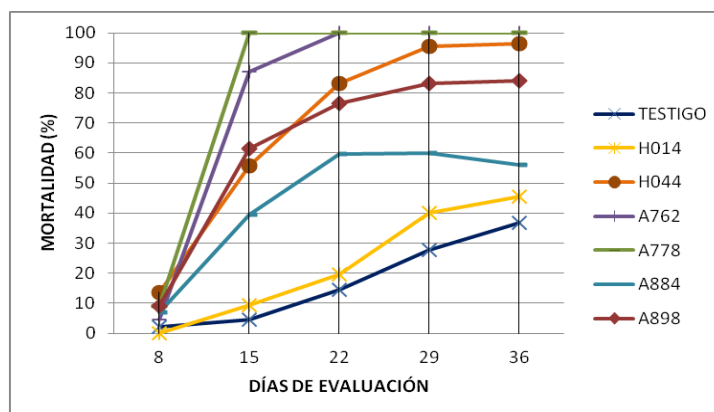
### 5.3.3. Evaluación de la patogenicidad causada por aislamientos nativos de *M. anisopliae* sobre ninfas de *E. colombianus*

Se evaluaron seis aislamientos de *M. anisopliae* obtenidos en la fase de reactivación que corresponden a los códigos H014, H044, A762, A778, A884 y A898 respecto a un testigo absoluto, para un total de siete tratamientos. De acuerdo al Análisis de Varianza (ANOVA) las variables PM, DM PV y Mortalidad total (%) fueron significativas para los tratamientos, el tiempo y la interacción (valor  $p < 0,0001$ ), es decir, las diferencias entre tratamientos no se mantienen a través del tiempo (Anexo 3). De acuerdo a la Hipótesis alternativa, esto se interpreta como la ocurrencia de actividad patogénica de por lo menos alguno de los aislamientos evaluados sobre ninfas de *E. colombianus*. La variable DV no fue estadísticamente significativa.

Las variables PM y Mortalidad (%) fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ ) (Anexo 3.1. y 3.2.) y la tendencia a través del tiempo fue similar entre si, como se observa en las figuras 12 y 13. El Análisis de comparación múltiple de medias Tukey mostró diferencias entre todos los tratamientos y el Testigo Absoluto, sin embargo el aislamiento H014 no presentó el mismo comportamiento. Los aislamientos A778 Y A762 fueron altamente significativos respecto a los demás, registrando mortalidad por encima del 80% 15 días después de la inoculación (DDI).



**Figura 12.** Efecto a través del tiempo de aislamientos nativos de *M. anisopliae* sobre la mortalidad de ninfas de *E. colombianus* pegadas a la estaca de brevo.



**Figura 13.** Mortalidad acumulada de ninfas de *E. colombianus* ocasionada por aislamientos nativos de *M. anisopliae*.

En la Tabla 6 se encuentra la mortalidad acumulada para cada tratamiento, observándose adicionalmente que el aislamiento A778 fue el más virulento del grupo evaluado ocasionando 100% de mortalidad en la población de ninfas 15 días después de la inoculación. Aunque el aislamiento A762 mostro un comportamiento altamente patogénico sobre la población de ninfas, la prueba de comparación mínima de medias Tukey no evidencio diferencias significativas entre este tratamiento y el A778 para ninguno de los tiempos de evaluación ( $p > 0.05$ ).

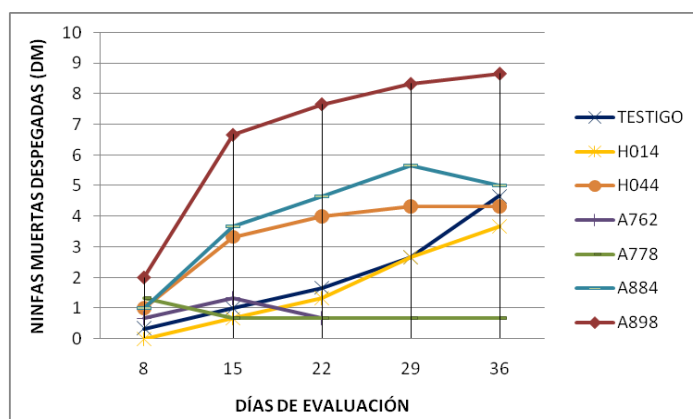
**Tabla 6.** Mortalidad acumulada (%) de ninfas de *E. colombianus* tratadas con aislamientos nativos de *M. anisopliae*.

TRATAMIENTO	DIAS DESPUES DE INOCULACIÓN (DDI)				
	8	15	22	29	36
1 Testigo Absoluto	2,2	4,4	14,4	27,8	36,7
2 H014	0,0	9,3	19,5	40,0	45,6*
3 H044	13,6	55,8	83,1	95,4	96,5*
4 A762	4,5	87,2	100,0	100,0	100,0*
5 A778	9,1	100,0	100,0	100,0	100,0*
6 A884	6,8	39,5	59,7	60,0	72,2*
7 A898	9,1	61,6	76,6	83,1	90,0 *

\*Tratamientos estadísticamente significativos. Prueba Tukey para comparación múltiple de medias ( $\alpha = 0,05$ )

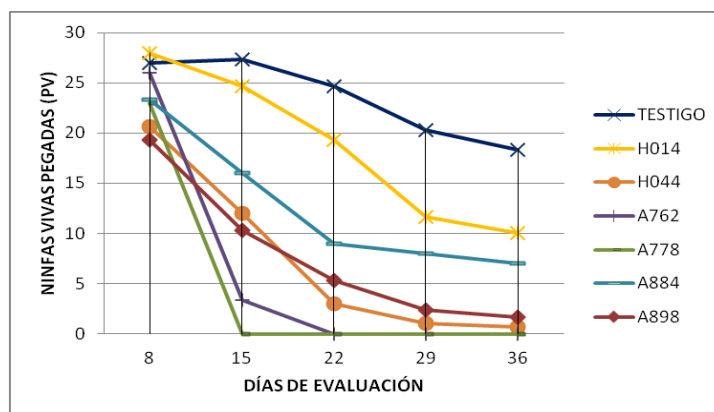
La variable DM arrojó diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ( $p = 0.0068$ ), lo que se interpreta de acuerdo a la Hipótesis alternativa como la ocurrencia de actividad patogénica

de por lo menos alguno de los aislamientos evaluados sobre ninfas de *E. colombianus*, ocasionando el desprendimiento del insecto de la estaca de brevo (Anexo 3.2.). En la figura 14, se observa la tendencia general a través del tiempo para esta variable, siendo el aislamiento A898 el tratamiento donde más se presentaron ninfas muertas despegadas de la estaca, mientras que en A778 este número no fue estadísticamente importante.



**Figura 14.** Efecto a través del tiempo de aislamientos nativos de *M. anisopliae* sobre el desprendimiento de ninfas muertas de *E. colombianus* de la estaca de brevo.

La variable PV fue significativa para los tratamientos, los tiempos y la interacción ( $p < 0,0001$ ), es decir, al menos uno de los aislamientos tiene un efecto sobre esta variable, el cual es variable a través del tiempo (Anexo 3.3.). En la figura 15 se observa como la mayor supervivencia de ninfas se presenta en el tratamiento testigo absoluto y H014; los mismos que presentaron la menor tasa de mortalidad. Por otro lado, en los tratamientos A762 y A778 no sobrevivieron ninguno de los individuos expuestos al hongo y de acuerdo al análisis de comparación múltiples de medias Tukey presentaron diferencias con todos los demás tratamientos.



**Figura 15.** Efecto de aislamientos nativos de *M. anisopliae* sobre la sobrevivencia de ninfas de *E. colombianus* pegadas a la estaca a través del tiempo.

La variable DV no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ( $p=0,1090$ ) (Anexo 3.4.), situación que concuerda con los resultados para las variables que evaluaron la mortalidad de ninfas, ya que la sobrevivencia fue baja por el efecto patológico del hongo.

Debido a que el aislamiento A778 alcanzó la máxima mortalidad en solo 15 días, presentó diferencias altamente significativas con respecto al testigo y exhibió signos de la presencia del hongo en todos los individuos muertos, se seleccionó este aislamiento como el más promisorio para la evaluación de  $CL_{50}$  y  $TL_{50}$ . Por otro lado, es importante resalta la evaluación de este aislamientos en otros estados de desarrollo del insecto, debido a su potencial como controlador, la alta mortalidad ocasionada y haber sido aislado a partir de quistes de *E. colombianus*, lo que aumentaría su efectividad en el control en campo ya que podría afectar una mayor población de la plaga.

En relación a los síntomas asociados a la invasión de los aislamientos nativos de *M. anisopliae*, los principales registros fueron: i) pérdida de coordinación en los movimientos de desplazamiento, ii) cambio en el color del integumento de blanco a amarillo, asociado a pérdida de turgencia y posterior deshidratación de la ninfa; iii) micelio blanco y micosis invasiva del cuerpo del insecto de color verde oliva, iv) amplia proliferación de micelio y desarrollo de estructuras reproductivas (conidióforos) y v) formaciones de sinemas (Fig. 16). El aislamiento 778 se presentaron micosis invasivas en todas las ninfas 8 días después de la aplicación del tratamiento.



**Figura 16.** Síntomas y signos de la enfermedad ocasionada por aislamientos nativos de *M. anisopliae* en ninfas de *E. colombianus*.

#### **5.3.4. Evaluación de la patogenicidad causada por aislamientos comerciales de *M. anisopliae* sobre ninfas de *E. colombianus***

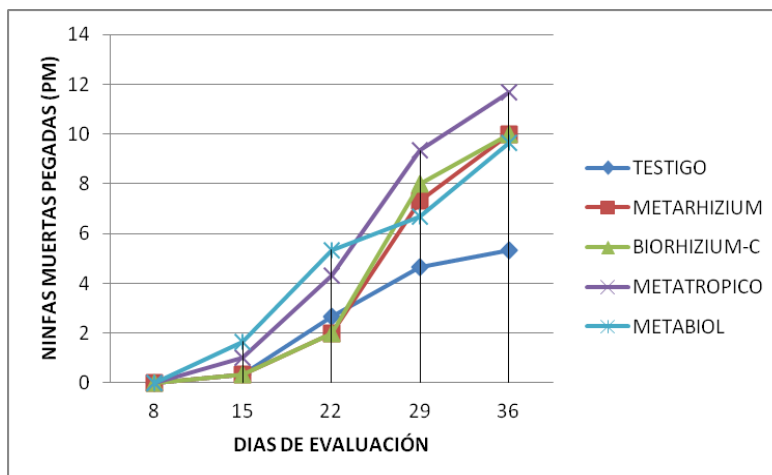
Se evaluaron cuatro aislamientos comerciales de *M. anisopliae* (Birhizium – C®, *Metarhizium* (Bioprotección), Metatropico®, Metabiol®) respecto a un testigo absoluto, para un total de cinco tratamientos. De acuerdo al Análisis de Varianza (ANOVA) las variables PM, PV y Mortalidad total (M%) fueron significativas para los tratamientos, el tiempo y la interacción, es decir, las diferencias entre tratamientos no se mantienen a través del tiempo. De acuerdo a la Hipótesis alternativa, esto se interpreta como la ocurrencia de actividad patogénica de por lo menos uno de los aislamientos evaluados sobre ninfas de *E. colombianus*. Las variables DM y DV no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (Anexo 4), asumiendo que los aislamientos comerciales de *M. anisopliae* no tienen efecto sobre el desprendimiento de ninfas de la estaca de brevo.

La variable PM fue estadísticamente significativa ( $p < 0,0308$ ), sin embargo, la prueba de comparación múltiple de medias Tukey no arrojó diferencias marcadas entre los tratamientos y solo el producto comercial Metatropico® presentó diferencias respecto al testigo absoluto ( $p = 0,0206$ ) (Anexo 4.1.). Aunque este aislamiento fue el más virulento del grupo de evaluación ( $p = 0,0163$ ) (Anexo 4.5.), la Mortalidad acumulada (M%) no superó el 50% 36 días después de la aplicación y registro una tasa similar al testigo absoluto (32,2% y 34,4% respectivamente) en el mismo tiempo (Tabla 7). En general los aislamientos comerciales de *M. anisopliae* que fueron evaluados en este trabajo no mostraron efectividad para el control de *E. colombianus*, presentando una patogenicidad baja y poca expresión de signos y síntomas en la población de ninfas. En las figuras 17 y 18 se observa la tendencia a través del tiempo para estas dos variables.

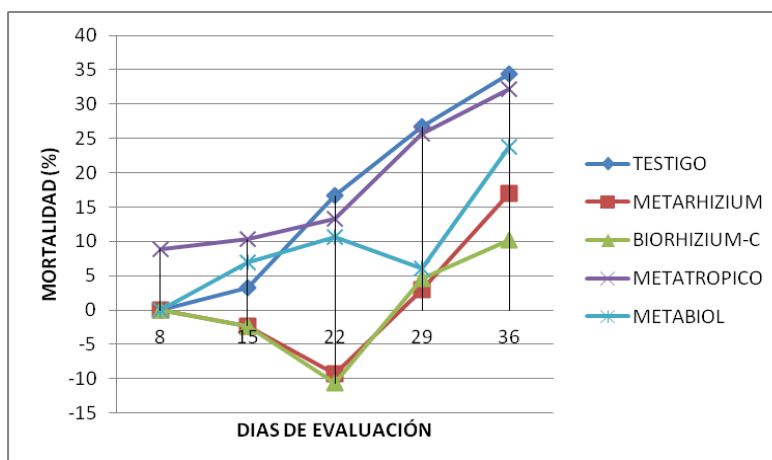
**Tabla 7.** Mortalidad acumulada (%) de ninfas de *E. colombianus* tratadas con aislamientos comerciales de *M. anisopliae*.

TRATAMIENTO	DIAS DESPUES DE INOCULACIÓN (DDI)				
	8	15	22	29	36
1 Testigo Absoluto	0,0	3,3	16,7	26,7	34,4
2 Metarhizium®	0,0	-2,3	-9,3	3,0	16,9
3 Biorhizium-C®	0,0	-2,3	-10,7	4,5	10,2
4 Metatropico®	8,9	10,3	13,3	25,8	32,2*
5 Metabiol®	0,0	6,9	10,7	6,1	23,7

\*Tratamientos estadísticamente significativos. Prueba Tukey para comparación múltiple de medias ( $\alpha = 0,05$ )



**Figura 17.** Efecto a través del tiempo de aislamientos comerciales de *M. anisopliae* sobre la mortalidad de ninfas de *E. colombianus* pegadas a la estaca de brevo.

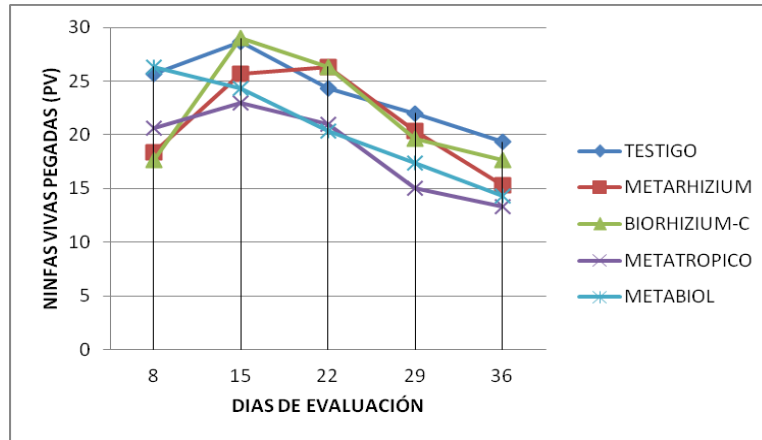


**Figura 18.** Mortalidad acumulada de ninfas de *E. colombianus* ocasionada por aislamientos comerciales de *M. anisopliae*.

Este resultado coincide con el encontrado para la variable PV, la cual fue estadísticamente significativa ( $p=0,0396$ ), donde el aislamiento Metatropico® fue el más sobresaliente de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias Tukey ( $p=0,0246$ ) (Anexo 4.3.) respecto al testigo absoluto. Aunque esta misma prueba no arrojó diferencias entre los aislamientos evaluados, el resultado es altamente demostrativo si se asocia con el poco desprendimiento de ninfas de la estaca de brevo y el alto porcentaje de la población que logro sobrevivir y pasar al siguiente instar ninfal o quiste. En la figura 19 se observa el comportamiento de esta variable a

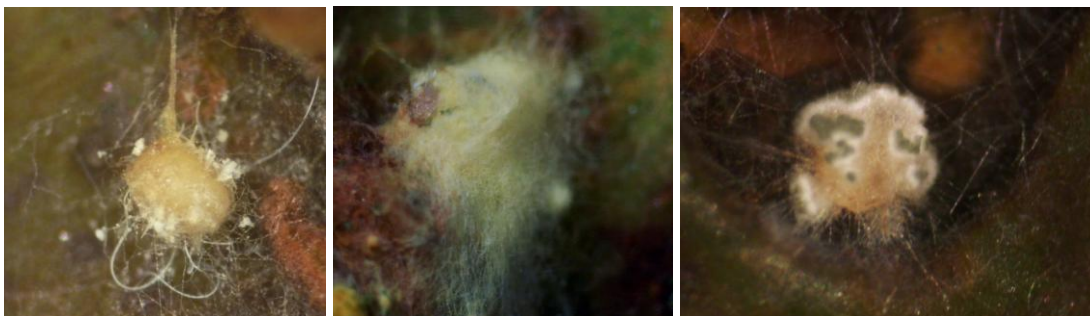


través del tiempo, vislumbrando claramente como en todos los aislamientos la población blanco se mantuvo constante y no se vio drásticamente afectada en tamaño.



**Figura 19.** Efecto a través del tiempo de aislamientos comerciales de *M. anisopliae* sobre la sobrevivencia de ninfas de *E. colombianus* pegadas a la estaca de brevo.

Los principales síntomas asociados a la invasión de los aislamientos comerciales de *M. anisopliae* fueron cambio en el color del integumento de blanco a amarillo, asociado a pérdida de turgencia y posterior deshidratación de la ninfa; micelio blanco a amarillo y micosis invasiva del cuerpo del insecto de color verde oliva, dándose una baja proliferación de micelio y desarrollo de estructuras reproductivas (conidióforos). La formación de sinemas para este bioensayo no fue tan marcada como la encontrada en aislamientos nativos, sin embargo también se observó 36 días después de la inoculación (Fig. 20).



**Figura 20.** Síntomas y signos de la enfermedad ocasionada por aislamientos comerciales de *M. anisopliae* en ninfas de *E. colombianus*.



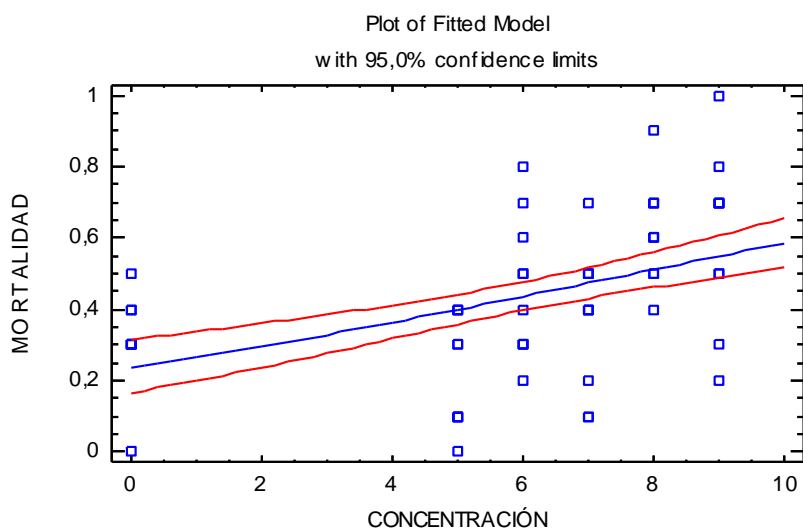
---

#### 5.4. Determinación de la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) y Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>)

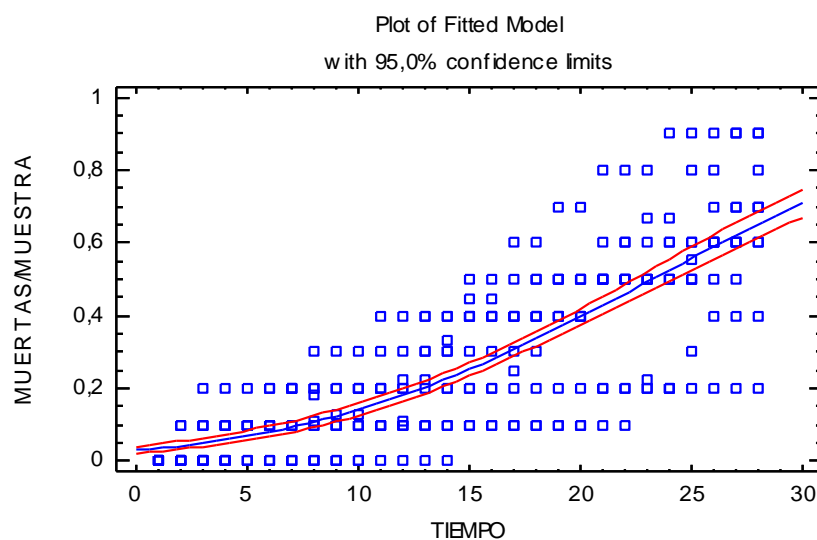
De acuerdo a los criterios de selección propuestos y con base en el análisis estadístico, se escogió el aislamiento H066 de *P. lilacinus* para estimar la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) y Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>), debido a que este fue aislado directamente de individuos de *E. colombianus* (procedencia) y no se observaron diferencias significativas en la comparación de medias con el aislamiento H069, tratamiento donde se observó la máxima tasa de mortalidad (55,7%).

Por otro lado, se seleccionó el aislamiento A778 dentro del grupo evaluado para *M. anisopliae*, primordialmente, porque fue el único que ocasionó mortalidad del 100% en la población objetivo en un periodo de tiempo de 15 días después de la inoculación, además de presentar diferencias altamente significativas con respecto al testigo y exhibir signos de la presencia del hongo en todos los individuos muertos.

Para el caso de *P. lilacinus* y mediante el Análisis Probit para los valores de mortalidad se estimó que la Concentración Letal Media para el aislamiento H066 es 10<sup>8</sup> conidias/ml (Fig. 21) con un Tiempo Letal Medio de 23,2 días (Fig. 22) ( $p < 0,001$  prueba de  $X^2$ ) (Anexo 5). Este resultado no coincide con lo hallado por Carvajal (2002) quien registra en sus estudios CL<sub>50</sub> de 10<sup>5</sup> conidias/ml para el mismo aislamiento. Cabe mencionar que al ser diferentes la metodología de evaluación y la población prueba no es posible hacer comparaciones, ya que la población objetivo en el caso previo estuvo compuesta por quistes y las concentraciones evaluadas fueron diferentes, por lo tanto, las diferencias cuantitativas son esperadas.

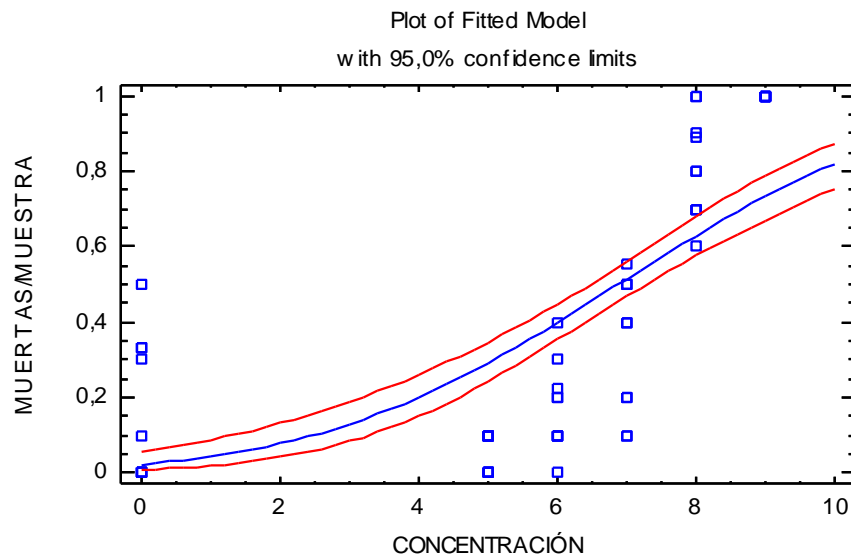


**Figura 21.** Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ) para el aislamiento H066 de *P. lilacinus*.

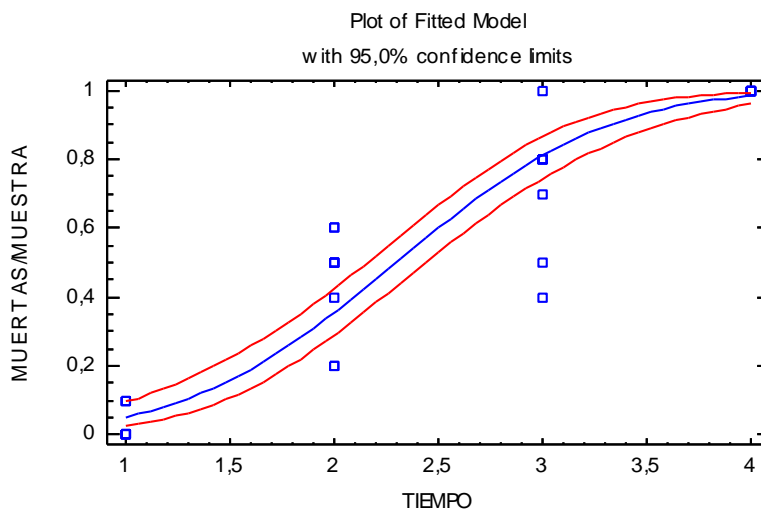


**Figura 22.** Tiempo Letal Media ( $CL_{50}$ ) para el aislamiento H066 de *P. lilacinus* a una Concentración de  $10^8$  conidias/ml.

Respecto al aislamiento A778 de *M. anisopliae* se obtuvo una Concentración Letal Media de  $10^7$  conidias/ml ( $p < 0,001$  prueba de  $X^2$ ) (Anexo 6 y Fig. 23) y un Tiempo Letal Medio de 2,3 días (Anexo 6 y Fig. 24).



**Figura 23.** Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ) para el aislamiento A778 de *M. anisopliae*.



**Figura 24.** Tiempo Letal Media ( $CL_{50}$ ) para el aislamiento A778 de *M. anisopliae* a una Concentración de  $10^7$  conidias/ml.

Existe una clara diferencia en la virulencia de este aislamiento respecto al evaluado para *P. lilacinus*, lo que sugiere una mayor potencial del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* para el control efectivo de *E. colombianus*. Estos resultados difieren de lo hallado por Lopera (2001),

---

quien al evaluar cinco aislamientos nativos de este hongo entomopatógeno, no evidenció una alta virulencia para ninguno de los tratamientos.

Así mismo, los resultados de esta investigación son de alto impacto, ya que a pesar de que los hongos entomopatógenos del género *Metarhizium* y *Paecilomyces* son reportados como patogénicos para otras especies de hemípteros como la filoxera *Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch.) (Hemiptera: Phylloxeridae) (Kirchmair et al. 2009), no existen estudios que busquen determinar la virulencia de aislamientos nativos sobre especies de hemípteros radicícolas para el Neotrópico, lo que aumentaría enormemente su potencial y efectividad para el control de *E. colombianus* en su estado morfológico de mayor susceptibilidad.

Así mismo, es importante dar continuidad en la investigación para determinar la susceptibilidad de otros estados morfológicos de este insecto a los dos aislamientos seleccionados, *P. lilacinus* H066 y *M. anisopliae* A778, con el fin de estimar la eficiencia en el control de la plaga bajo condiciones de campo, donde las poblaciones naturales de *E. colombianus* se caracterizan por presentar solapamiento generacional, presentándose incidencia directa o indirecta de todos los estados de desarrollo sobre el hospedero en una misma escala de tiempo.

En este sentido, es importante señalar que el aislamiento A778 de *M. anisopliae* fue aislado a partir de quistes recolectados en campo afectados por este aislamiento, planteando la hipótesis de tener un mayor control de la población dada su capacidad de producir morbilidad y mortalidad en otro estado de desarrollo diferente al evaluado en este trabajo, lo que permitiría obtener mejores resultados en campo.

---

## 6. CONCLUSIONES

- Los aislamientos nativos fueron más virulentos respecto a los productos comerciales para las dos especies de hongos evaluados en este estudio.
- Ninguno de los hongos entomopatógenos evaluados tiene un efecto disuador marcado en la adherencia de las ninfas a la estaca de brevo de tal forma que limiten su alimentación.
- Los aislamientos nativos de *M. anisopliae* son altamente virulentos, llegando a ocasionar hasta un 100% de mortalidad en ninfas de *E. colombianus* en cortos periodos de tiempo.
- Dada las características cuantitativas y cualitativas de los aislamientos nativos de *M. anisopliae*, este hongo entomopatógeno se considera altamente promisorio para el control de *E. colombianus* en condiciones de campo.
- A pesar de que todos los aislamientos nativos de *P. lilacinus* evaluados fueron patogénicos en poblaciones de ninfas de *E. colombianus*, el proceso infectivo es lento y solo se observó mortalidad de ninfas superior al 50% cinco semanas después de la aplicación.
- Es importante validar en campo la efectividad de los aislamientos de *P. lilacinus* y *M. anisopliae* seleccionados para el control de perla de tierra colombiana con el fin de formular una estrategia de manejo integrada encaminada a obtener un mayor control de esta plaga en todos los estados de desarrollo. Dichas estrategias de manejo incorporarían la aplicación del hongo entomopatógeno en combinación con extractos vegetales o productos tensoactivos que ayuden al hongo a ingresar en el cuerpo del insecto, acelerando el proceso infectivo, para finalmente aumentar su potencial de control.

---

## 7. RECOMENDACIONES

- Es importante la realización de estudios posteriores que evalúen el comportamiento patogénico de mezclas de aislamientos nativos de *M. anisopliae* y *P. lilacinus*, con el fin de determinar si las condiciones medioambientales tienen un alto impacto negativo sobre la efectividad del hongo en *E. colombianus*.
- La correcta capacitación de productores en el uso de hongos entomopatógenos es vital para garantizar un adecuado uso de esta estrategia de manejo, ya que existe poca claridad sobre la importancia que tiene las características de los productos comerciales que hacen que sean efectivos o no dependiendo del origen de la cepa y su grado de especificidad.
- Se recomienda aumentar el número de evaluaciones en bioensayos futuros destinados a estimar la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) y Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>), ya que las realizadas en este trabajo no fueron las adecuadas para una buena aproximación del modelo de verosimilitud, debido a limitantes administrativas que impidieron una adecuada ejecución del protocolo.

---

## 8. LITERATURA CITADA

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, pp.265-267.
- Ahmad G, M. y Ahmad K, T., 2010. Biological potential of *Paecilomyces lilacinus* on pathogenesis of *Meloidogyne javanica* infecting tomato plant. *European Journal of Applied Sciences*, 2(2), pp.80–84.
- Alves, S.B., Pereira, R. M., Stimac, J. L. y Vieira, S. A. 1996. Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above-freezing temperatures. *Biocontrol Science and Technology*, 6(4), pp.575-581.
- Bastidas, A., Velásquez S., E., Marín M., P., Benavides M., P., Bustillo P., A.E. y Orozco C., F.J. 2009. Evaluación de preformulados de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin para el control de la broca del café. *Revista Agronomía*, 17(1), pp.44 – 61.
- Botton, M. y Colleta, V., 2010. Avaliação da resistência de cultivares de *Vitis rotundifolia* à pérola da terra (Hemiptera: Margarodidae) na região sul do Brasil. *Acta Scientiarum Agronomy*, 32(2), pp.213–216.
- Botton, M., Texeira, I., Bavaresco, A. y Pastori, P.L. 2010. Use of soil insecticides to control the Brazilian ground pearl (Hemiptera: Margarodidae) in vineyards. *Revista Colombiana de Entomología* 36 (1), pp.20-24.
- Campos, D., 2010. Revisão taxonômica e análise cladística de Termitococcinae Jakubski, 1965 (Hemiptera: Coccoidea: Margarodidae). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. p.65.
- Cañedo, V. y Ames, T. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), p.62.
- Carvajal, L.D., 2002. Estudios del efecto patogenico de algunos microorganismos sobre *Eurhizococcus colombianus* Jakubski (Hemiptera: Margarodidae). Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. p.58.
- Castrillo, L.A., Roberts, D.W. y Vandenberg, J.D. 2005. The fungal past, present and future: Germination, ramification and reproduction. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89, pp.46–56.
- Castrillón, C., Pineda, S.M. y Urrea, C.F. 2000a. Observaciones sobre el comportamiento etológico de la perla de tierra en cultivos de mora y tomate de arbol. En: III Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales CDTF. pp.119–124.

- 
- Castrillón, C., Urrea, C.F. y Pineda, S.M. 2000b. Algunos aspectos biomorfológicos y agroecológicos de la perla de tierra en zonas agroecológicas Fn. En: III Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales CDTF. pp.125–131.
- Corpoica, 2009a. Protocolo para recolección de insectos en campo IN-R-499. Corporación Colombiana para la Investigación Agropecuaria-CORPOICA. p.6
- Corpoica, 2009b. Protocolo para el ingreso y procesamiento de muestras de insectos al laboratorio de entomología IN-R-500. Corporación Colombiana para la Investigación Agropecuaria-CORPOICA. p.5
- Delgado, J., 2006. Distribución radical de perla de tierra *Eurhizococcus colombianus* y su relacion con factores ambientales en el cultivo de brevo (*Ficus carica*). Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. p.78.
- Devi, K.U., Reineke, A., Rao, N.N., Maheswara, C.U. y Padmavathi, J., 2006. Genetic diversity, reproductive biology and speciation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Genome*, 504, pp.495–504.
- Driesche, R.G.V., Carruthers, R.I., Center, T., Hoddle, M.S., Hough-Goldstein, J., Morin, L. Smith, L., Wagner, D.L., Blossey, B., Brancatini, V., Casagrande, R., Causton, C.E., Coetzee, J.A., Cudam, J., Ding, J., Fowler, S.V., Frankm, J.H., Fuester, R., Goolsby, J., Grodowitz, M., Heard, T.A., Hill, M.P., Hoffmann, J.H., Huber, J., Julien, M., Kairo, M.T.K., Kenis, M., Masonw, P., Medal, J., Messing, R., Miller, R., Moore, A., Neuenschwander, P., Newman, R., Norambuena, H., Palmer, W.A., Pemberton, R., Pérez, A., Panduro, Pratt, P.D., Rayamajhi, M., Salomae, S., Sands, D., Schooler, S., Schwarzländer, M., Sheppard, A., Shawaf, R., Tipping, P.W. y Klinken, R.D.V. 2010. Classical biological control for the protection of natural ecosystems. *Biological Control*, 54, p.S2-S33. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.03.003>.
- EL-Shanshoury, A.R., El-Sayed, S.A., Mahnoud Y.A.G. y Khalefa, D.M. 2005. Evaluation of *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* and *Arthrobotrys dactyloide* as Biocontrol Agents for *Meloidogyne incognita* unde Green House Condition. *Pakintan Journal of Biological Sciences*, 8(11), pp.1511-1515.
- Foldi, I., 2005. Ground pearls□ : a generic revision of the Margarodidae sensu stricto (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea). *Annales de la Société Entomologique de France*, 41(1), pp.81–125.
- Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA). 2011. Anuario Estadístico de frutas y hortalizas 2004-2008 y sus calendarios de siembras y cosechas. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR). p.290.



- 
- Faria, M., Hajek, A. E. y Wraight, S. P. 2009. Imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*, 51, pp.346-354.
- Faria, M., Hotchkiss, J. H., Hajek, A.E. y Wraight, S.P. 2010. Debilitation in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and implication with respect to viability determinations and mycopesticide quality assessments. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105, pp.74–83.
- Fernández C., Londoño, M. y Jaramillo, J. 2003. Susceptibilidad de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) a diferentes aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y su efecto adicional sobre otros lepidópteros asociados a la coliflor. *Revista Colombiana de Entomología*, 29(2), pp.211-219.
- Foldi, I. 2005. Ground pearls: a generic revision of the Margarodidae *sensu stricto* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea). *Annales de la Société Entomologique de France*, 41, pp.81-125.
- Gardezi, S.R.A. 2006. Studies on the application of fungi and bacteria controlling insect pests in Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. *Archives of Phitopathology and Plant Protection*, 39(1), pp.49 – 67.
- Gortori, M.C., Galarza, B.C., Cazau, M.C y Hours, R.A. 2008. Comparison of the biological properties of two strains of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson associated to their antagonistic effect onto *Toxocara canis* eggs. *Malaysian Journal of Microbiology*, 4(2), pp.35– 41.
- Guarín, J.H. y Carvajal, L.D. 2002. La perla de tierra *Eurhizococcus colombianus* Jakubski (Hemiptera: Margarodidae) en los frutales de clima frío. Posibilidades para su manejo. En: IV Seminario Nacional de Frutales de Clima frío moderado. CORPOICA, UPB, CDTF, pp.153–162.
- Gullan, P.J. y Cook, L.G. 2007. Phylogeny and higher classification of the scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea). *Zootaxa*, 1668, pp.413 – 425.
- Hajek, A E y Leger, R.J.S. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annual Review Entomology*, 39, pp.293–322.
- Herrera, F., Carballo, M. y Shannon, P. 1999. Eficacia de cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre *Bemisia tabaci*, en el laboratorio. *Manejo Integrado de plagas*, 54, pp.37-43.
- Hickel, E.R., Peruzzo, E.L. y Schuck, E. 2001. Control of the ground-pearl *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel) (Hemiptera: Margarodidae) with chemigation. *Neotropical Entomology*, 30 (1), pp.127-132.

- 
- Holdridge, L. 1996. Ecología basada en Zonas de Vida. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA. San José de Costa Rica, p.225.
- Humber, R.A. 2007. Recent phylogenetically based reclassifications of fungal pathogens of invertebrates. Online: <http://www.sipweb.org/fungi/humber.pdf>. pp.1-5.
- Ibrahim, L., Butt, T.M., Beckett, A. y Clark, S. J. 1999. The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen, *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 106 (6) *Mycological Research*, 103 (7), pp. 901-907.
- Ibrahim, L., Butt, T.M. y Jenkinson, P. 2002. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 106 (6), pp.705-715.
- Inglis, G.D., Duke, G.M., Goettel, M.S. y Kabaluk, J.T. 2008. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98, pp.101–113.
- Inglis, P.W. y Tigano, M.S. 2006. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp . (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS Sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 29(1), pp.132–136.
- Jackson, M.A., Dunlap, C.A. y Jaronski, S.T. 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*, 55, pp.129–145.
- Kirchmair, M., Neuhauser, S., Strasser, H., Voloshchuk, N., Hoffmann, M. y Huber, L. 2009. Biological control of grape phylloxera. A historical review and future prospects. *Acta Horticulturae*, 816, pp.13-18. Online: [http://www.actahort.org/books/816/816\\_1.htm](http://www.actahort.org/books/816/816_1.htm)
- Kondo, T. 2001. Las Cochinillas de Colombia (Hemiptera: Coccoidea). *Biota Colombiana*, 2(1), pp.31–47.
- Kondo, T. y Gomez, C. 2008. la perla de tierra, *Eurhizococcus colombianus*, una nueva plaga de la vid, *Vitis labrusca* L. en el Valle del Cauca. *Novedades Técnicas*, pp.34–40.
- Leemon, D.M. y Jonsson, N.N. 2008. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, pp.40–49.
- Liu, B. y Tzeng, Y. 2012. Development and applications of destruxins: A review. *Biotechnology Advances*, 30(6), pp.1242–1254.
- Liu, H., Skinner, M., Brownbridge, M. y Parker, B.L. 2003. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug , *Lygus lineolaris* ( Hemiptera: Miridae ). *Journal of Invertebrate Pathology*, 82(3), pp.139–147.

- 
- Lopera, L. 2001. Evaluación de la patogenicidad de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* Mestch. (Sorokin), sobre *Eurhizococcus colombianus* Jakubski (Hemiptera: Margarodidae) en mora. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias, p.60.
- Londoño, M.E., Arevalo, H.A. y Tobón W.A. 2010. Aspectos biológicos de la perla de tierra *Eurhizococcus colombianus* (Jakubski, 1965) (Hemiptera: Margarodidae). En: Memorias VII Seminario Internacional de Frutas Tropicales. Agroindustria e Innovación. Memorias. Corporación Colombiana De Investigación Agropecuaria, CORPOICA, Universidad Pontificia Bolivariana, UPB y Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales, CDTF. p.100.
- Meyling, N. V., Lübeck, M., Buckley, E. P., Eilenberg, J. y Rehner, S. A. 2009. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Molecular Ecology*, pp.1282–1293.
- Meyling, N. V. y Hajek, A. E. 2010. Principles from community and metapopulation ecology: application to fungal entomopathogens. *BioControl*, pp.39–54.
- Molina, J.P., Samuels, R.I., Machado, I.R. y Dolinski, C. 2007. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 96, pp.187–192.
- Nunes L, R., Almeida, N., Nunes, L.F., Santos, A.H., Garcia, H.H. y Luz, C. 2010. Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology*, 107, pp.1271–1274.
- Padilla-Melo, G.N., Bernal-Urbe, M.G., Vélez-Arango, P.E. y Montoya-Restrepo, E.C. 2000. Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes ordenes insectiles. *Cenicafé*, 51(1), pp.28–40.
- Papierok, B. y Hajek, A.E. 1997. Fungi: Entomophthorales. En: *Manual of Techniques in Insect Pathology*, pp.187-212
- Park, J., Hargreaves, J.R., McConville, E.J., Stirling, G.R., Ghisalberti, E.L. y Sivasithamparan, K. 2004., Production of leucinostatins and nematicidal activity of Australian isolates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Letters in Applied Microbiology*, pp.271-276.
- Pell, J K, Hannam, J.J. y Steinkraus, D.C. 2010. Conservation biological control using fungal entomopathogens. *BioControl*, 55, pp.187-198.
- Quiñones, W., Vicente, B., Torres., F., Archbold, R., Murillo, W., Londoño, M. y Echeverri, F. 2008. Chemical Composition of Ground Pearl (*Eurhizococcus colombianus*) Cysts. *Molecules*, 13, pp.190-194.

- 
- Rodríguez S, M., Gerding P, M. y France I, A., 2006. Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* Meyrick (LEPIDÓPTERA: GELECHIIDAE ). *Agricultura tecnica*, 66(2), pp.151–158.
- Roy, H.E., Brodie, E.L. y Chandler, D. 2010. Deep space and hidden depths: understanding the evolution and ecology of fungal entomopathogens. *BioControl*, pp.1–6.
- Sánchez, D. y Bellotti, A. 1997. Evaluación de la patogenicidad de hongos Hyphomycetes sobre la mosca blanca de la yuca, *Aleurotrachelus socialis*. Informe final Convenio Cooperativo CIAT-COLCIENCIAS. CIAT Palmira. Colombia. p.21.
- Schenck, S. 2004. Control of Nematodes in Tomato with *Paecilomyces lilacinus* Strain 251. *Vegetable Report*, 5, p.5.
- Shah, F.A., Wang, C.S. y Butt, T.M. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 251(2), pp.259-266.
- Shahid, A.A., Rao, A.Q., Bakhsh, A., y Husnain, T. 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. *Archive Biological Science*, 64(1), pp.21–42.
- Soria, S. de J. y Gallotti, B. J. 1986. O *Margarodes* da Videira *Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae): Biología ecológica e controle no sul do Brasil. EMBRAPA CNPUV. *Circular Técnica*, 13, p.22.
- Strik, B. C., Clark, J. R., Finn, C. E. y Bañados, M. de P. 2007. Worldwide blackberry production. *Horticulture Technology*, 17 (2), pp.205-213.
- Tafur, R., Toro, J., Perfetti, J., Ruiz, D. y Morales, J. 2006. Plan Frutícola Nacional (PFN). Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Fondo Nacional de Fomento Hortofrutícola, Asohofructol, SAG. p.43.
- Tamayo P.J. 2003. Principales enfermedades del tomate de árbol, la mora y el lulo en Colombia. Corporacion Colombiana para la Investigación Agropecuaria, Corpoica, Regional 4. *Boletín técnico*, 12, p.30.
- Tamayo, P. y A. Peláez. 2000. Caracterización de daños y pérdidas causadas por enfermedades del fruto de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) en Antioquia. En: SEMINARIO FRUTALES DE CLIMA FRÍO MODERADO (2000: Manizales). Memorias del Tercer Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Manizales: Litoas, 174-178 pp.
- Tanada Y. y Kaya, H.K., 1993. Insect Pathology. Academic Press, Inc. San Diego, CA. p.666.

- 
- Teixeira, I., Botton, M. y Enimar L, A. 2002. Avaliação de Inseticidas Visando ao Controle de *Eurhizococcus brasiliensis* (Hempel) (Hemiptera: Margarodidae) em Novos Plantios de Videira. *Neotropical Entomology*, 31(3), pp.457–461.
- Téllez-Jurado, A. M., Cruz, G., Mercado, Y., Asaff, A. y Arana-Cuenca, A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*, 30, pp.73–80.
- Throne, J.E., Weaver, D.K. y Baker, J.E. 1995. Probit Analysis. Asseising goodness-of-fit based on backtransformation and Residuals. *Journal of Economic Entomology* 88 (5):1513-1516.
- Vega, F.E. Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N.K., Monzón, A., Ownley, B. H., Pell, J. K., Rangel, D E.N. y Roy, H. E. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2, pp.149–159.
- Vélez, P.E., Posada, F.J., Marín, P., González, M.T., Osorio, E. y Bustillo, A.E. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. *Cenicafé*. p.37.
- Wang, J., Wang, J., Liu, F. y Pan, C. 2010. Enhancing the virulence of *Paecilomyces lilacinus* against *Meloidogyne incognita* eggs by overexpression of a serine protease. *Biotechnology Letters*, 32, pp.1159–1166.
- Wang, C., Skrobek, A. y Butt, T.M. 2011. Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85, pp.168–174.
- Williams, D.L. 2003. Biology and pathology of interactions between fungi and invertebrates. *Vet Clin Exot Anim*, 6, pp.289–300.
- Xavier-Santos, S., Magalhães, B. y Luna-Alves L., E.A. 1999. Differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* (Hyphomycetes). *Revista de Microbiología*, 30, pp.47-51.

---

## ANEXOS

**Anexo 1.** Análisis de Varianza (ANOVA). Evaluación de patogenicidad de aislamientos nativos de *P. lilacinus* sobre ninfas de *E. colombianus*.

### Anexo 1.1. Variable PM

#### The Mixed Procedure

##### Model Information

Data Set	WORK.PAECILOMYCESNATIVOS
Dependent Variable	PM
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

##### Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	9	Testigo H065 H066 H067 H068 H069 H070 H071 H072
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

##### Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	60
Columns in Z	27
Subjects	1
Max Obs Per Subject	135
Observations Used	135
Observations Not Used	0
Total Observations	135

##### Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		5.2078
AR(1)	UE(TTOS)	0.3173
Residual		3.7004

##### Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	445.1
AIC (smaller is better)	451.1
AICC (smaller is better)	451.3
BIC (smaller is better)	455.0

The Mixed Procedure

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	8	18	2.78	0.0342
TIEMPO	4	72	121.55	<.0001
TTOS*TIEMPO	32	72	3.05	<.0001

Differences of Least Squares Means

Effect	TTOS	TIEMPO	_TTOS	_TIEMPO	Adjustment	Adj P
TTOS	Testigo		H065		Tukey	0.0973
TTOS	Testigo		H066		Tukey	0.0437
TTOS	Testigo		H067		Tukey	0.2621
TTOS	Testigo		H068		Tukey	0.5838
TTOS	Testigo		H069		Tukey	0.1302
TTOS	Testigo		H070		Tukey	0.7714
TTOS	Testigo		H071		Tukey	0.1724
TTOS	Testigo		H072		Tukey	0.9952
TTOS	H065		H066		Tukey	1.0000
TTOS	H065		H067		Tukey	0.9995
TTOS	H065		H068		Tukey	0.9485
TTOS	H065		H069		Tukey	1.0000
TTOS	H065		H070		Tukey	0.8358
TTOS	H065		H071		Tukey	1.0000
TTOS	H065		H072		Tukey	0.3650
TTOS	H066		H067		Tukey	0.9813
TTOS	H066		H068		Tukey	0.7883
TTOS	H066		H069		Tukey	0.9995
TTOS	H066		H070		Tukey	0.6032
TTOS	H066		H071		Tukey	0.9973
TTOS	H066		H072		Tukey	0.1921
TTOS	H067		H068		Tukey	0.9993
TTOS	H067		H069		Tukey	1.0000
TTOS	H067		H070		Tukey	0.9876
TTOS	H067		H071		Tukey	1.0000
TTOS	H067		H072		Tukey	0.6992
TTOS	H068		H069		Tukey	0.9773
TTOS	H068		H070		Tukey	1.0000
TTOS	H068		H071		Tukey	0.9921
TTOS	H068		H072		Tukey	0.9556
TTOS	H069		H070		Tukey	0.9016
TTOS	H069		H071		Tukey	1.0000
TTOS	H069		H072		Tukey	0.4512
TTOS	H070		H071		Tukey	0.9485
TTOS	H070		H072		Tukey	0.9938
TTOS	H071		H072		Tukey	0.5451
TIEMPO		1		2	Tukey-Kramer	0.0007
TIEMPO		1		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		4		5	Tukey-Kramer	0.0002

---

## Anexo 1.2. Variable DM

### The Mixed Procedure

#### Model Information

Data Set	WORK.PAECILOMYCESNATIVOS
Dependent Variable	DM
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

#### Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	9	Testigo H065 H066 H067 H068 H069 H070 H071 H072
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

#### Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	60
Columns in Z	27
Subjects	1
Max Obs Per Subject	135
Observations Used	135
Observations Not Used	0
Total Observations	135

#### Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		0
AR(1)	UE(TTOS)	0.6033
Residual		1.5669

#### Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	312.7
AIC (smaller is better)	316.7
AICC (smaller is better)	316.8
BIC (smaller is better)	319.3



The Mixed Procedure

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	8	18	0.41	0.9011
TIEMPO	4	72	18.36	<.0001
TTOS*TIEMPO	32	72	1.03	0.4410

Anexo 1.3. Variable PV

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK.PAECILOMYCESNATIVOS
Dependent Variable	PV
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Parameter
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	9	Testigo H065 H066 H067 H068 H069 H070 H071 H072
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

Dimensions

Covariance Parameters	2
Columns in X	60
Columns in Z	27
Subjects	1
Max Obs Per Subject	135
Observations Used	135
Observations Not Used	0
Total Observations	135

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		7.4852
TIEMPO	UE(TTOS)	4.7000

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	483.6
AIC (smaller is better)	487.6
AICC (smaller is better)	487.7
BIC (smaller is better)	490.2

The Mixed Procedure

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	8	18	2.09	0.0927
TIEMPO	4	72	142.19	<.0001
TTOS*TIEMPO	32	72	2.53	0.0006

Anexo 1.4. Variable DV

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK.PAECILOMYCESNATIVOS
Dependent Variable	DV
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Parameter
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	9	Testigo H065 H066 H067 H068 H069 H070 H071 H072
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

Dimensions

Covariance Parameters	2
Columns in X	60
Columns in Z	27
Subjects	1
Max Obs Per Subject	135
Observations Used	135
Observations Not Used	0
Total Observations	135

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		0.6222
TIEMPO	UE(TTOS)	2.4148

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	399.1
AIC (smaller is better)	403.1
AICC (smaller is better)	403.2
BIC (smaller is better)	405.7

The Mixed Procedure

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	8	18	0.55	0.8048
TIEMPO	4	72	6.91	<.0001
TTOS*TIEMPO	32	72	0.58	0.9563

Anexo 1.5. Mortalidad Total (%)

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK.PAECILOMYCESNATIVOS
Dependent Variable	M
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	9	Testigo H065 H066 H067 H068 H069 H070 H071 H072
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	60
Columns in Z	27
Subjects	1
Max Obs Per Subject	135
Observations Used	135
Observations Not Used	0
Total Observations	135

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		5.4199
AR(1)	UE(TTOS)	0.3276
Residual		4.7699

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	464.1
AIC (smaller is better)	470.1
AICC (smaller is better)	470.4
BIC (smaller is better)	474.0

The Mixed Procedure

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	8	18	2.76	0.0349
TIEMPO	4	72	140.31	<.0001
TTOS*TIEMPO	32	72	2.23	0.0025

Differences of Least Squares Means

Effect	TTOS	TIEMPO	_TTOS	_TIEMPO	Adjustment	Adj P
TTOS	Testigo		H065		Tukey	0.0493
TTOS	Testigo		H066		Tukey	0.0464
TTOS	Testigo		H067		Tukey	0.2828
TTOS	Testigo		H068		Tukey	0.5977
TTOS	Testigo		H069		Tukey	0.1115
TTOS	Testigo		H070		Tukey	0.6534
TTOS	Testigo		H071		Tukey	0.1721
TTOS	Testigo		H072		Tukey	0.9704
TTOS	H065		H066		Tukey	1.0000
TTOS	H065		H067		Tukey	0.9826
TTOS	H065		H068		Tukey	0.8080
TTOS	H065		H069		Tukey	0.9999
TTOS	H065		H070		Tukey	0.7597
TTOS	H065		H071		Tukey	0.9985
TTOS	H065		H072		Tukey	0.3243
TTOS	H066		H067		Tukey	0.9791
TTOS	H066		H068		Tukey	0.7924
TTOS	H066		H069		Tukey	0.9999
TTOS	H066		H070		Tukey	0.7428
TTOS	H066		H071		Tukey	0.9980
TTOS	H066		H072		Tukey	0.3100
TTOS	H067		H068		Tukey	0.9995
TTOS	H067		H069		Tukey	0.9996
TTOS	H067		H070		Tukey	0.9985
TTOS	H067		H071		Tukey	1.0000
TTOS	H067		H072		Tukey	0.8647
TTOS	H068		H069		Tukey	0.9595
TTOS	H068		H070		Tukey	1.0000
TTOS	H068		H071		Tukey	0.9906
TTOS	H068		H072		Tukey	0.9925
TTOS	H069		H070		Tukey	0.9383
TTOS	H069		H071		Tukey	1.0000
TTOS	H069		H072		Tukey	0.5606
TTOS	H070		H071		Tukey	0.9826
TTOS	H070		H072		Tukey	0.9964
TTOS	H071		H072		Tukey	0.7078
TIEMPO		1		2	Tukey-Kramer	0.0002
TIEMPO		1		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		4		5	Tukey-Kramer	<.0001

---

**Anexo 2.** Análisis de Varianza (ANOVA). Evaluación de patogenicidad de aislamientos comerciales de *P. lilacinus* sobre ninfas de *E. colombianus*.

Anexo 2.1. Variable PM

The Mixed Procedure		
Model Information		
Data Set	WORK.COMERCIALESP	
Dependent Variable	PM	
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive	
Subject Effect	UE(TTOS)	
Estimation Method	REML	
Residual Variance Method	Profile	
Fixed Effects SE Method	Model-Based	
Degrees of Freedom Method	Containment	
Class Level Information		
Class	Levels	Values
TTOS	8	TESTIGO BIOSTAT SAFELOMY BIOMYCES PAECILOM PAECILOT LILACINO NEMOCROP
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5
Dimensions		
Covariance Parameters	3	
Columns in X	54	
Columns in Z	24	
Subjects	1	
Max Obs Per Subject	120	
Observations Used	120	
Observations Not Used	0	
Total Observations	120	
Covariance Parameter Estimates		
Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		0
AR(1)	UE(TTOS)	0.6013
Residual		3.7151
Fit Statistics		
-2 Res Log Likelihood	347.2	
AIC (smaller is better)	351.2	
AICC (smaller is better)	351.4	
BIC (smaller is better)	353.6	

The Mixed Procedure

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	7	16	2.92	0.0358
TIEMPO	4	64	68.71	<.0001
TTOS*TIEMPO	28	64	1.67	0.0469

Differences of Least Squares Means

Effect	TTOS	TIEMPO	_TTOS	_TIEMPO	Adjustment	Adj P
TTOS	TESTIGO		BIOSTAT		Tukey	0.9449
TTOS	TESTIGO		SAFELOMY		Tukey	0.9580
TTOS	TESTIGO		BIOMYCES		Tukey	0.9993
TTOS	TESTIGO		PAECILOM		Tukey	0.9842
TTOS	TESTIGO		PAECILOT		Tukey	0.5514
TTOS	TESTIGO		LILACINO		Tukey	1.0000
TTOS	TESTIGO		NEMOCROP		Tukey	0.6554
TTOS	BIOSTAT		SAFELOMY		Tukey	1.0000
TTOS	BIOSTAT		BIOMYCES		Tukey	0.9986
TTOS	BIOSTAT		PAECILOM		Tukey	1.0000
TTOS	BIOSTAT		PAECILOT		Tukey	0.1075
TTOS	BIOSTAT		LILACINO		Tukey	0.8682
TTOS	BIOSTAT		NEMOCROP		Tukey	0.1456
TTOS	SAFELOMY		BIOMYCES		Tukey	0.9993
TTOS	SAFELOMY		PAECILOM		Tukey	1.0000
TTOS	SAFELOMY		PAECILOT		Tukey	0.1191
TTOS	SAFELOMY		LILACINO		Tukey	0.8910
TTOS	SAFELOMY		NEMOCROP		Tukey	0.1607
TTOS	BIOMYCES		PAECILOM		Tukey	1.0000
TTOS	BIOMYCES		PAECILOT		Tukey	0.2798
TTOS	BIOMYCES		LILACINO		Tukey	0.9931
TTOS	BIOMYCES		NEMOCROP		Tukey	0.3592
TTOS	PAECILOM		PAECILOT		Tukey	0.1607
TTOS	PAECILOM		LILACINO		Tukey	0.9449
TTOS	PAECILOM		NEMOCROP		Tukey	0.2138
TTOS	PAECILOT		LILACINO		Tukey	0.6896
TTOS	PAECILOT		NEMOCROP		Tukey	1.0000
TTOS	LILACINO		NEMOCROP		Tukey	0.7863
TIEMPO		1		2	Tukey-Kramer	0.0003
TIEMPO		1		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		4		5	Tukey-Kramer	0.0334

---

## Anexo 2.2. Variable DM

### The Mixed Procedure

#### Model Information

Data Set	WORK.COMERCIALESP
Dependent Variable	DM
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

#### Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	8	TESTIGO BIOSTAT SAFELOMY BIOMYCES PAECILOM PAECILOT LILACINO NEMOCROP
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

#### Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	54
Columns in Z	24
Subjects	1
Max Obs Per Subject	120
Observations Used	120
Observations Not Used	0
Total Observations	120

#### Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		0.6943
AR(1)	UE(TTOS)	0.3648
Residual		1.7849

#### Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	320.2
AIC (smaller is better)	326.2
AICC (smaller is better)	326.5
BIC (smaller is better)	329.7

### The Mixed Procedure

#### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	7	16	4.31	0.0074
TIEMPO	4	64	44.24	<.0001
TTOS*TIEMPO	28	64	1.71	0.0399

---

Differences of Least Squares Means						
Effect	TTOS	TIEMPO	_TTOS	_TIEMPO	Adjustment	Adj P
TTOS	TESTIGO		BIOSTAT		Tukey	0.9976
TTOS	TESTIGO		SAFELOMY		Tukey	0.9869
TTOS	TESTIGO		BIOMYCES		Tukey	1.0000
TTOS	TESTIGO		PAECILOM		Tukey	0.9999
TTOS	TESTIGO		PAECILOT		Tukey	0.6477
TTOS	TESTIGO		LILACINO		Tukey	0.0736
TTOS	TESTIGO		NEMOCROP		Tukey	0.0381
TTOS	BIOSTAT		SAFELOMY		Tukey	1.0000
TTOS	BIOSTAT		BIOMYCES		Tukey	0.9795
TTOS	BIOSTAT		PAECILOM		Tukey	1.0000
TTOS	BIOSTAT		PAECILOT		Tukey	0.9399
TTOS	BIOSTAT		LILACINO		Tukey	0.2192
TTOS	BIOSTAT		NEMOCROP		Tukey	0.1219
TTOS	SAFELOMY		BIOMYCES		Tukey	0.9399
TTOS	SAFELOMY		PAECILOM		Tukey	0.9995
TTOS	SAFELOMY		PAECILOT		Tukey	0.9795
TTOS	SAFELOMY		LILACINO		Tukey	0.3021
TTOS	SAFELOMY		NEMOCROP		Tukey	0.1745
TTOS	BIOMYCES		PAECILOM		Tukey	0.9976
TTOS	BIOMYCES		PAECILOT		Tukey	0.4816
TTOS	BIOMYCES		LILACINO		Tukey	0.0435
TTOS	BIOMYCES		NEMOCROP		Tukey	0.0221
TTOS	PAECILOM		PAECILOT		Tukey	0.8382
TTOS	PAECILOM		LILACINO		Tukey	0.1377
TTOS	PAECILOM		NEMOCROP		Tukey	0.0736
TTOS	PAECILOT		LILACINO		Tukey	0.8045
TTOS	PAECILOT		NEMOCROP		Tukey	0.6058
TTOS	LILACINO		NEMOCROP		Tukey	0.9999
TIEMPO		1		2	Tukey-Kramer	0.4044
TIEMPO		1		3	Tukey-Kramer	0.0212
TIEMPO		1		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		3	Tukey-Kramer	0.3291
TIEMPO		2		4	Tukey-Kramer	0.0008
TIEMPO		2		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		4	Tukey-Kramer	0.0319
TIEMPO		3		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		4		5	Tukey-Kramer	<.0001

### Anexo 2.3. Variable PV

#### The Mixed Procedure

##### Model Information

Data Set	WORK.COMERCIALESP
Dependent Variable	PV
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment



Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	8	TESTIGO BIOSTAT SAFELOMY BIOMYCES PAECIOM PAECILOT LILACINO NEMOCROP
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	54
Columns in Z	24
Subjects	1
Max Obs Per Subject	120
Observations Used	120
Observations Not Used	0
Total Observations	120

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		0.6746
AR(1)	UE(TTOS)	0.4750
Residual		6.9142

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	412.7
AIC (smaller is better)	418.7
AICC (smaller is better)	419.0
BIC (smaller is better)	422.2

The Mixed Procedure

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	7	16	3.04	0.0311
TIEMPO	4	64	44.99	<.0001
TTOS*TIEMPO	28	64	4.19	<.0001

Differences of Least Squares Means

Effect	TTOS	TIEMPO	_TTOS	_TIEMPO	Adjustment	Adj P
TTOS	TESTIGO		BIOSTAT		Tukey	0.9990
TTOS	TESTIGO		SAFELOMY		Tukey	1.0000
TTOS	TESTIGO		BIOMYCES		Tukey	0.9975
TTOS	TESTIGO		PAECIOM		Tukey	1.0000
TTOS	TESTIGO		PAECILOT		Tukey	0.4540
TTOS	TESTIGO		LILACINO		Tukey	0.8915
TTOS	TESTIGO		NEMOCROP		Tukey	0.2352
TTOS	BIOSTAT		SAFELOMY		Tukey	1.0000
TTOS	BIOSTAT		BIOMYCES		Tukey	1.0000
TTOS	BIOSTAT		PAECIOM		Tukey	0.9896
TTOS	BIOSTAT		PAECILOT		Tukey	0.2055
TTOS	BIOSTAT		LILACINO		Tukey	0.6033
TTOS	BIOSTAT		NEMOCROP		Tukey	0.0922
TTOS	SAFELOMY		BIOMYCES		Tukey	0.9998
TTOS	SAFELOMY		PAECIOM		Tukey	0.9997
TTOS	SAFELOMY		PAECILOT		Tukey	0.3433
TTOS	SAFELOMY		LILACINO		Tukey	0.7970

---

TTOS	SAFELOMY	NEMOCROP	Tukey	0.1667
TTOS	BIOMYCES	PAECILOM	Tukey	0.9818
TTOS	BIOMYCES	PAECILOT	Tukey	0.1789
TTOS	BIOMYCES	LILACINO	Tukey	0.5525
TTOS	BIOMYCES	NEMOCROP	Tukey	0.0790
TTOS	PAECILOM	PAECILOT	Tukey	0.6033
TTOS	PAECILOM	LILACINO	Tukey	0.9627
TTOS	PAECILOM	NEMOCROP	Tukey	0.3433
TTOS	PAECILOT	LILACINO	Tukey	0.9896
TTOS	PAECILOT	NEMOCROP	Tukey	0.9997
TTOS	LILACINO	NEMOCROP	Tukey	0.8915
TIEMPO	1	2	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO	1	3	Tukey-Kramer	0.6861
TIEMPO	1	4	Tukey-Kramer	0.0012
TIEMPO	1	5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO	2	3	Tukey-Kramer	0.0005
TIEMPO	2	4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO	2	5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO	3	4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO	3	5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO	4	5	Tukey-Kramer	<.0001

## Anexo 2.4. Variable DV

### The Mixed Procedure

#### Model Information

Data Set	WORK.COMERCIALESP
Dependent Variable	DV
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

#### Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	8	TESTIGO BIOSTAT SAFELOMY BIOMYCES PAECILOM PAECILOT LILACINO NEMOCROP
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

#### Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	54
Columns in Z	24
Subjects	1
Max Obs Per Subject	120
Observations Used	120
Observations Not Used	0
Total Observations	120

#### Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		2.31E-17
AR(1)	UE(TTOS)	0.4876
Residual		3.0788

#### Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	343.6
AIC (smaller is better)	347.6
AICC (smaller is better)	347.7
BIC (smaller is better)	349.9

#### The Mixed Procedure

##### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	7	16	0.79	0.6090
TIEMPO	4	64	80.81	<.0001
TTOS*TIEMPO	28	64	3.18	<.0001

## Anexo 2.5. Mortalidad Total (%)

#### The Mixed Procedure

##### Model Information

Data Set	WORK.COMERCIALESP
Dependent Variable	M
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containmen

##### Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	8	TESTIGO BIOSTAT SAFELOMY BIOMYCES PAECILOM PAECILOT LILACINO NEMOCROP
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

##### Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	54
Columns in Z	24
Subjects	1
Max Obs Per Subject	120
Observations Used	120
Observations Not Used	0
Total Observations	120

## Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		0.4962
AR(1)	UE(TTOS)	0.6102
Residual		6.3434

## Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	391.2
AIC (smaller is better)	397.2
AICC (smaller is better)	397.6
BIC (smaller is better)	400.8

## The Mixed Procedure

## Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	7	16	4.93	0.0040
TIEMPO	4	64	94.45	<.0001
TTOS*TIEMPO	28	64	1.74	0.0344

## Differences of Least Squares Means

Effect	TTOS	TIEMPO	_TTOS	_TIEMPO	Adjustment	Adj P
TTOS	TESTIGO		BIOSTAT		Tukey	0.9999
TTOS	TESTIGO		SAFELOMY		Tukey	1.0000
TTOS	TESTIGO		BIOMYCES		Tukey	0.9992
TTOS	TESTIGO		PAECILOM		Tukey	0.9999
TTOS	TESTIGO		PAECILOT		Tukey	0.3011
TTOS	TESTIGO		LILACINO		Tukey	0.4680
TTOS	TESTIGO		NEMOCROP		Tukey	0.0603
TTOS	BIOSTAT		SAFELOMY		Tukey	1.0000
TTOS	BIOSTAT		BIOMYCES		Tukey	1.0000
TTOS	BIOSTAT		PAECILOM		Tukey	1.0000
TTOS	BIOSTAT		PAECILOT		Tukey	0.1570
TTOS	BIOSTAT		LILACINO		Tukey	0.2664
TTOS	BIOSTAT		NEMOCROP		Tukey	0.0275
TTOS	SAFELOMY		BIOMYCES		Tukey	1.0000
TTOS	SAFELOMY		PAECILOM		Tukey	1.0000
TTOS	SAFELOMY		PAECILOT		Tukey	0.2060
TTOS	SAFELOMY		LILACINO		Tukey	0.3388
TTOS	SAFELOMY		NEMOCROP		Tukey	0.0378
TTOS	BIOMYCES		PAECILOM		Tukey	1.0000
TTOS	BIOMYCES		PAECILOT		Tukey	0.1270
TTOS	BIOMYCES		LILACINO		Tukey	0.2200
TTOS	BIOMYCES		NEMOCROP		Tukey	0.0217
TTOS	PAECILOM		PAECILOT		Tukey	0.1570
TTOS	PAECILOM		LILACINO		Tukey	0.2664
TTOS	PAECILOM		NEMOCROP		Tukey	0.0275
TTOS	PAECILOT		LILACINO		Tukey	1.0000
TTOS	PAECILOT		NEMOCROP		Tukey	0.9749
TTOS	LILACINO		NEMOCROP		Tukey	0.8912
TIEMPO		1		2	Tukey-Kramer	0.0001
TIEMPO		1		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		4		5	Tukey-Kramer	<.0001

---

**Anexo 3.** Análisis de Varianza (ANOVA). Evaluación de patogenicidad de aislamientos nativos de *M. anisopliae* sobre ninfas de *E. colombianus*.

Anexo 3.1. Variable PM

The Mixed Procedure						
Model Information						
Data Set	WORK.METN					
Dependent Variable	PM					
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive					
Subject Effect	UE(TTOS)					
Estimation Method	REML					
Residual Variance Method	Profile					
Fixed Effects SE Method	Model-Based					
Degrees of Freedom Method	Containment					
Class Level Information						
Class	Levels	Values				
TTOS	7	TESTIGO	H014	H044	A762	A778
		A884	A898			
UE	3	1	2	3		
TIEMPO	5	1	2	3	4	5
Dimensions						
Covariance Parameters						3
Columns in X						48
Columns in Z						21
Subjects						1
Max Obs Per Subject						105
Observations Used						105
Observations Not Used						0
Total Observations						105
Covariance Parameter Estimates						
Cov Parm	Subject	Estimate				
UE(TTOS)		5.21E-17				
AR(1)	UE(TTOS)	0.6857				
Residual		9.1567				
Fit Statistics						
-2 Res Log Likelihood		356.5				
AIC (smaller is better)		360.5				
AICC (smaller is better)		360.7				
BIC (smaller is better)		362.6				

The Mixed Procedure

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	6	14	31.38	<.0001
TIEMPO	4	56	187.37	<.0001
TTOS*TIEMPO	24	56	14.82	<.0001

Differences of Least Squares Means

Effect	TTOS	TIEMPO	_TTOS	_TIEMPO	Adjustment	Adj P
TTOS	TESTIGO		H014		Tukey	0.1395
TTOS	TESTIGO		H044		Tukey	<.0001
TTOS	TESTIGO		A762		Tukey	<.0001
TTOS	TESTIGO		A778		Tukey	<.0001
TTOS	TESTIGO		A884		Tukey	0.0076
TTOS	TESTIGO		A898		Tukey	0.0016
TTOS	H014		H044		Tukey	0.0036
TTOS	H014		A762		Tukey	<.0001
TTOS	H014		A778		Tukey	<.0001
TTOS	H014		A884		Tukey	0.6645
TTOS	H014		A898		Tukey	0.2288
TTOS	H044		A762		Tukey	0.1846
TTOS	H044		A778		Tukey	0.0774
TTOS	H044		A884		Tukey	0.0686
TTOS	H044		A898		Tukey	0.2809
TTOS	A762		A778		Tukey	0.9980
TTOS	A762		A884		Tukey	0.0006
TTOS	A762		A898		Tukey	0.0028
TTOS	A778		A884		Tukey	0.0003
TTOS	A778		A898		Tukey	0.0011
TTOS	A884		A898		Tukey	0.9716
TIEMPO		1		2	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		4	Tukey-Kramer	0.0017
TIEMPO		3		5	Tukey-Kramer	0.0022
TIEMPO		4		5	Tukey-Kramer	0.8102

### Anexo 3.2. Variable DM

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK.METN
Dependent Variable	DM
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

# Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	7	TESTIGO H014 H044 A762 A778 A884 A898
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

# Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	48
Columns in Z	21
Subjects	1
Max Obs Per Subject	105
Observations Used	105
Observations Not Used	0
Total Observations	105

# Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		0
AR(1)	UE(TTOS)	0.7831
Residual		3.8475

# Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	278.2
AIC (smaller is better)	282.2
AICC (smaller is better)	282.4
BIC (smaller is better)	284.3

# The Mixed Procedure

# Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	6	14	4.90	0.0068
TIEMPO	4	56	12.68	<.0001
TTOS*TIEMPO	24	56	2.23	0.0071

# Differences of Least Squares Means

Effect	TTOS	TIEMPO	_TTOS	_TIEMPO	Adjustment	Adj P
TTOS	TESTIGO		H014		Tukey	0.9999
TTOS	TESTIGO		H044		Tukey	0.9477
TTOS	TESTIGO		A762		Tukey	0.9586
TTOS	TESTIGO		A778		Tukey	0.9586
TTOS	TESTIGO		A884		Tukey	0.7739
TTOS	TESTIGO		A898		Tukey	0.0494
TTOS	H014		H044		Tukey	0.8460
TTOS	H014		A762		Tukey	0.9938
TTOS	H014		A778		Tukey	0.9938
TTOS	H014		A884		Tukey	0.6059
TTOS	H014		A898		Tukey	0.0289
TTOS	H044		A762		Tukey	0.4917
TTOS	H044		A778		Tukey	0.4917
TTOS	H044		A884		Tukey	0.9992
TTOS	H044		A898		Tukey	0.2559

---

TTOS	A762		A778	Tukey	1.0000
TTOS	A762		A884	Tukey	0.2751
TTOS	A762		A898	Tukey	0.0089
TTOS	A778		A884	Tukey	0.2751
TTOS	A778		A898	Tukey	0.0089
TTOS	A884		A898	Tukey	0.4642
TIEMPO		1	2	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1	3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1	4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1	5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2	3	Tukey-Kramer	0.4489
TIEMPO		2	4	Tukey-Kramer	0.0399
TIEMPO		2	5	Tukey-Kramer	0.0111
TIEMPO		3	4	Tukey-Kramer	0.1964
TIEMPO		3	5	Tukey-Kramer	0.0738
TIEMPO		4	5	Tukey-Kramer	0.6608

### Anexo 3.3. Variable PV

#### The Mixed Procedure

##### Model Information

Data Set	WORK.METN
Dependent Variable	PV
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

##### Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	7	TESTIGO H014 H044 A762 A778 A884 A898
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

##### Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	48
Columns in Z	21
Subjects	1
Max Obs Per Subject	105
Observations Used	105
Observations Not Used	0
Total Observations	105

##### Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		0.7872
AR(1)	UE(TTOS)	0.4775
Residual		5.0270



# Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	340.1
AIC (smaller is better)	346.1
AICC (smaller is better)	346.5
BIC (smaller is better)	349.3

# The Mixed Procedure

## Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	6	14	52.27	<.0001
TIEMPO	4	56	237.88	<.0001
TTOS*TIEMPO	24	56	13.48	<.0001

## Differences of Least Squares Means

Effect	TTOS	TIEMPO	_TTOS	_TIEMPO	Adjustment	Adj P
TTOS	TESTIGO		H014		Tukey	0.0490
TTOS	TESTIGO		H044		Tukey	<.0001
TTOS	TESTIGO		A762		Tukey	<.0001
TTOS	TESTIGO		A778		Tukey	<.0001
TTOS	TESTIGO		A884		Tukey	<.0001
TTOS	TESTIGO		A898		Tukey	<.0001
TTOS	H014		H044		Tukey	<.0001
TTOS	H014		A762		Tukey	<.0001
TTOS	H014		A778		Tukey	<.0001
TTOS	H014		A884		Tukey	0.0095
TTOS	H014		A898		Tukey	<.0001
TTOS	H044		A762		Tukey	0.9041
TTOS	H044		A778		Tukey	0.4306
TTOS	H044		A884		Tukey	0.0293
TTOS	H044		A898		Tukey	1.0000
TTOS	A762		A778		Tukey	0.9659
TTOS	A762		A884		Tukey	0.0037
TTOS	A762		A898		Tukey	0.8034
TTOS	A778		A884		Tukey	0.0008
TTOS	A778		A898		Tukey	0.3153
TTOS	A884		A898		Tukey	0.0450
TIEMPO		1		2	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		4		5	Tukey-Kramer	0.4921

---

## Anexo 3.4. Variable DV

### The Mixed Procedure

#### Model Information

Data Set	WORK.METN
Dependent Variable	DV
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Parameter
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

#### Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	7	TESTIGO H014 H044 A762 A778 A884 A898
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

#### Dimensions

Covariance Parameters	2
Columns in X	48
Columns in Z	21
Subjects	1
Max Obs Per Subject	105
Observations Used	105
Observations Not Used	0
Total Observations	105

#### Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		0.3548
TIEMPO	UE(TTOS)	0.7214

#### Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	231.6
AIC (smaller is better)	235.6
AICC (smaller is better)	235.8
BIC (smaller is better)	237.7

### The Mixed Procedure

#### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	6	14	2.17	0.1090
TIEMPO	4	56	49.93	<.0001
TTOS*TIEMPO	24	56	3.90	<.0001

## Anexo 3.5. Mortalidad Total

### The Mixed Procedure

#### Model Information

Data Set	WORK.METN
Dependent Variable	M
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

#### Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	7	TESTIGO H014 H044 A762 A778 A884 A898
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

#### Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	48
Columns in Z	21
Subjects	1
Max Obs Per Subject	105
Observations Used	105
Observations Not Used	0
Total Observations	105

#### Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		1.2317
AR(1)	UE(TTOS)	0.4937
Residual		4.4025

#### Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	332.3
AIC (smaller is better)	338.3
AICC (smaller is better)	338.7
BIC (smaller is better)	341.4

### The Mixed Procedure

#### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	6	14	50.32	<.0001
TIEMPO	4	56	388.32	<.0001
TTOS*TIEMPO	24	56	18.36	<.0001

Differences of Least Squares Means

Effect	TTOS	TIEMPO	_TTOS	_TIEMPO	Adjustment	Adj P
TTOS	TESTIGO		H014		Tukey	0.0479
TTOS	TESTIGO		H044		Tukey	<.0001
TTOS	TESTIGO		A762		Tukey	<.0001
TTOS	TESTIGO		A778		Tukey	<.0001
TTOS	TESTIGO		A884		Tukey	<.0001
TTOS	TESTIGO		A898		Tukey	<.0001
TTOS	H014		H044		Tukey	<.0001
TTOS	H014		A762		Tukey	<.0001
TTOS	H014		A778		Tukey	<.0001
TTOS	H014		A884		Tukey	0.0269
TTOS	H014		A898		Tukey	0.0002
TTOS	H044		A762		Tukey	0.6288
TTOS	H044		A778		Tukey	0.2735
TTOS	H044		A884		Tukey	0.0227
TTOS	H044		A898		Tukey	0.9714
TTOS	A762		A778		Tukey	0.9912
TTOS	A762		A884		Tukey	0.0011
TTOS	A762		A898		Tukey	0.2079
TTOS	A778		A884		Tukey	0.0003
TTOS	A778		A898		Tukey	0.0662
TTOS	A884		A898		Tukey	0.1065
TIEMPO		1		2	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		4		5	Tukey-Kramer	0.2488

**Anexo 4.** Análisis de Varianza (ANOVA). Evaluación de patogenicidad de aislamientos comerciales de *M. anisopliae* sobre ninfas de *E. colombianus*.

Anexo 4.1. Variable PM

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK.COMERCIALESM
Dependent Variable	PM
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Parameter
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	5	TESTIGO METARHIZ BIORHIZI METATROP METABIOL
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

# Dimensions

Covariance Parameters	2
Columns in X	36
Columns in Z	15
Subjects	1
Max Obs Per Subject	75
Observations Used	75
Observations Not Used	0
Total Observations	75

## Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		0.3167
TIEMPO	UE(TTOS)	1.9900

## Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	209.6
AIC (smaller is better)	213.6
AICC (smaller is better)	213.9
BIC (smaller is better)	215.0

## The Mixed Procedure

### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	4	10	4.16	0.0308
TIEMPO	4	40	124.06	<.0001
TTOS*TIEMPO	16	40	2.35	0.0145

## The Mixed Procedure

### Differences of Least Squares Means

Effect	TTOS	TIEMPO	_TTOS	_TIEMPO	Adjustment	Adj P
TTOS	TESTIGO		METARHIZ		Tukey	0.3615
TTOS	TESTIGO		BIORHIZI		Tukey	0.2817
TTOS	TESTIGO		METATROP		Tukey	0.0206
TTOS	TESTIGO		METABIOL		Tukey	0.0791
TTOS	METARHIZ		BIORHIZI		Tukey	0.9996
TTOS	METARHIZ		METATROP		Tukey	0.3615
TTOS	METARHIZ		METABIOL		Tukey	0.8211
TTOS	BIORHIZI		METATROP		Tukey	0.4550
TTOS	BIORHIZI		METABIOL		Tukey	0.9018
TTOS	METATROP		METABIOL		Tukey	0.9018
TIEMPO		1		2	Tukey-Kramer	0.6164
TIEMPO		1		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		3	Tukey-Kramer	0.0001
TIEMPO		2		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		4		5	Tukey-Kramer	0.0015

## Anexo 4.2. Variable DM

### The Mixed Procedure

#### Model Information

Data Set	WORK.COMERCIALESM
Dependent Variable	DM
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

#### Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	5	TESTIGO METARHIZ BIORHIZI METATROP METABIOL
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

#### Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	36
Columns in Z	15
Subjects	1
Max Obs Per Subject	75
Observations Used	75
Observations Not Used	0
Total Observations	75

#### Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		1.4371
AR(1)	UE(TTOS)	0.5753
Residual		1.3811

#### Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	180.9
AIC (smaller is better)	186.9
AICC (smaller is better)	187.5
BIC (smaller is better)	189.1

### The Mixed Procedure

#### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	4	10	2.03	0.1662
TIEMPO	4	40	23.73	<.0001
TTOS*TIEMPO	16	40	1.02	0.4558

---

## Anexo 4.3. Variable PV

### The Mixed Procedure

#### Model Information

Data Set	WORK.COMERCIALESM
Dependent Variable	PV
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

#### Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	5	TESTIGO METARHIZ BIORHIZI METATROP METABIOL
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

#### Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	36
Columns in Z	15
Subjects	1
Max Obs Per Subject	75
Observations Used	75
Observations Not Used	0
Total Observations	75

#### Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		8.26E-17
AR(1)	UE(TTOS)	0.4644
Residual		7.4093

#### Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	259.8
AIC (smaller is better)	263.8
AICC (smaller is better)	264.0
BIC (smaller is better)	265.2

#### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	4	10	4.02	0.0339
TIEMPO	4	40	79.70	<.0001
TTOS*TIEMPO	16	40	3.91	0.0002

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK.COMERCIALESM
Dependent Variable	PV
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	5	TESTIGO METARHIZ BIORHIZI METATROP METABIOL
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	36
Columns in Z	15
Subjects	1
Max Obs Per Subject	75
Observations Used	75
Observations Not Used	0
Total Observations	75

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		8.26E-17
AR(1)	UE(TTOS)	0.4644
Residual		7.4093

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	259.8
AIC (smaller is better)	263.8
AICC (smaller is better)	264.0
BIC (smaller is better)	265.2

The Mixed Procedure

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	4	10	3.80	0.0396
TIEMPO	4	40	32.71	<.0001
TTOS*TIEMPO	16	40	3.58	0.0005



---

The Mixed Procedure						
Differences of Least Squares Means						
Effect	TTOS	TIEMPO	_TTOS	_TIEMPO	Adjustment	Adj P
TTOS	TESTIGO		METARHIZ		Tukey	0.3561
TTOS	TESTIGO		BIORHIZI		Tukey	0.6738
TTOS	TESTIGO		METATROP		Tukey	0.0246
TTOS	TESTIGO		METABIOL		Tukey	0.1905
TTOS	METARHIZ		BIORHIZI		Tukey	0.9716
TTOS	METARHIZ		METATROP		Tukey	0.4215
TTOS	METARHIZ		METABIOL		Tukey	0.9891
TTOS	BIORHIZI		METATROP		Tukey	0.1905
TTOS	BIORHIZI		METABIOL		Tukey	0.8202
TTOS	METATROP		METABIOL		Tukey	0.6738
TIEMPO		1		2	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		3	Tukey-Kramer	0.2020
TIEMPO		1		4	Tukey-Kramer	0.0320
TIEMPO		1		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		3	Tukey-Kramer	0.0129
TIEMPO		2		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		4		5	Tukey-Kramer	0.0028

#### Anexo 4.4.Variable DV

The Mixed Procedure	
Model Information	
Data Set	WORK.COMERCIALESM
Dependent Variable	DV
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Parameter
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information		
Class	Levels	Values
TTOS	5	TESTIGO METARHIZ BIORHIZI METATROP METABIOL
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

Dimensions	
Covariance Parameters	2
Columns in X	36
Columns in Z	15
Subjects	1
Max Obs Per Subject	75
Observations Used	75
Observations Not Used	0
Total Observations	75

#### Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		0.9033
TIEMPO	UE(TTOS)	3.8700

#### Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	244.8
AIC (smaller is better)	248.8
AICC (smaller is better)	249.0
BIC (smaller is better)	250.2

#### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	4	10	1.70	0.2261
TIEMPO	4	40	33.91	<.0001
TTOS*TIEMPO	16	40	3.13	0.0017

### Anexo 4.5. Mortalidad Total

#### The Mixed Procedure

##### Model Information

Data Set	WORK.COMERCIALESM
Dependent Variable	M
Covariance Structures	Variance Components, Autoregressive
Subject Effect	UE(TTOS)
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

##### Class Level Information

Class	Levels	Values
TTOS	5	TESTIGO METARHIZ BIORHIZI METATROP METABIOL
UE	3	1 2 3
TIEMPO	5	1 2 3 4 5

##### Dimensions

Covariance Parameters	3
Columns in X	36
Columns in Z	15
Subjects	1
Max Obs Per Subject	75
Observations Used	75
Observations Not Used	0
Total Observations	75

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Subject	Estimate
UE(TTOS)		0.7284
AR(1)	UE(TTOS)	0.5561
Residual		2.6560

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	208.0
AIC (smaller is better)	214.0
AICC (smaller is better)	214.5
BIC (smaller is better)	216.1

The Mixed Procedure

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
TTOS	4	10	5.14	0.0163
TIEMPO	4	40	147.73	<.0001
TTOS*TIEMPO	16	40	2.74	0.0050

Differences of Least Squares Means

Effect	TTOS	TIEMPO	_TTOS	_TIEMPO	Adjustment	Adj P
TTOS	TESTIGO		METARHIZ		Tukey	0.9998
TTOS	TESTIGO		BIORHIZI		Tukey	1.0000
TTOS	TESTIGO		METATROP		Tukey	0.0302
TTOS	TESTIGO		METABIOL		Tukey	0.4057
TTOS	METARHIZ		BIORHIZI		Tukey	0.9993
TTOS	METARHIZ		METATROP		Tukey	0.0394
TTOS	METARHIZ		METABIOL		Tukey	0.4937
TTOS	BIORHIZI		METATROP		Tukey	0.0276
TTOS	BIORHIZI		METABIOL		Tukey	0.3785
TTOS	METATROP		METABIOL		Tukey	0.4340
TIEMPO		1		2	Tukey-Kramer	0.0331
TIEMPO		1		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		1		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		3	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		2		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		4	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		3		5	Tukey-Kramer	<.0001
TIEMPO		4		5	Tukey-Kramer	<.0001

---

## Anexo 5. Análisis Probit. Estimación CL<sub>50</sub> y TL<sub>50</sub> aislamiento H066 de *P. lilacinus*

### Anexo 5.1. Análisis Probit. Estimación CL<sub>50</sub>

#### Probit Procedure

##### Iteration History for Parameter Estimates

Iter	Ridge	Loglikelihood	Intercept	concentracion
0	0	-415.88831	0	0
1	0	-397.17855	-0.685829933	0.0889236653
2	0	-397.12524	-0.72545505	0.094238313
3	0	-397.12524	-0.725641584	0.0942635471
4	0	-397.12524	-0.725641584	0.0942635471

#### Model Information

Data Set	WORK.PROBITH066
Events Variable	muertos
Trials Variable	numero
Number of Observations	60
Number of Events	260
Number of Trials	600
Name of Distribution	Normal
Log Likelihood	-397.1252411

#### Parameter Information

Parameter	Effect
Intercept	Intercept
concentracion	concentracion

#### Last Evaluation of the Negative of the Gradient

Intercept	concentracion
2.9358728E-7	1.0144327E-7

#### Last Evaluation of the Negative of the Hessian

	Intercept	concentracion
Intercept	368.04630248	2198.3647277
concentracion	2198.3647277	16049.076829

#### Probit Procedure

##### Goodness-of-Fit Tests

Statistic	Value	DF	Pr > ChiSq
Pearson Chi-Square	99.0327	58	0.0006
L.R. Chi-Square	115.0629	58	<.0001

# Response-Covariate Profile

Response Levels 2  
Number of Covariate Values 60

All variances and covariances have been multiplied by the heterogeneity factor H= 1.7075.

## Type III Analysis of Effects

Effect	DF	Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
concentracion	1	15.1858	<.0001

## Analysis of Parameter Estimates

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	95% Confidence Limits	Chi- Square	Pr > ChiSq
Intercept	1	-0.7256	0.1597	-1.0387 -0.4126	20.64	<.0001
concentracion	1	0.0943	0.0242	0.0469 0.1417	15.19	<.0001

## Probit Model in Terms of Tolerance Distribution

MU	SIGMA
7.69800847	10.6085548

## Estimated Covariance Matrix for Tolerance Parameters

	MU	SIGMA
MU	0.718044	1.205019
SIGMA	1.205019	7.410976

## Probit Procedure

### Probit Analysis on concentracion

Probability	concentr...	95% Fiducial Limits
0.01	-16.981	-41.314 -9.103
0.02	-14.089	-35.381 -7.180
0.03	-12.254	-31.618 -5.958
0.04	-10.874	-28.789 -5.037
0.05	-9.752	-26.489 -4.287
0.06	-8.796	-24.532 -3.647
0.07	-7.958	-22.817 -3.085
0.08	-7.208	-21.283 -2.582
0.09	-6.525	-19.888 -2.123
0.10	-5.897	-18.605 -1.699
0.15	-3.297	-13.304 0.065
0.20	-1.230	-9.114 1.489
0.25	0.543	-5.551 2.744
0.30	2.135	-2.405 3.924
0.35	3.610	0.405 5.121
0.40	5.010	2.851 6.480
0.45	6.365	4.798 8.213
0.50	7.698	6.245 10.388
0.55	9.031	7.408 12.847
0.60	10.386	8.457 15.478
0.65	11.786	9.477 18.261
0.70	13.261	10.516 21.231

---

0.75	14.853	11.615	24.458
0.80	16.626	12.822	28.067
0.85	18.693	14.218	32.287
0.90	21.293	15.962	37.607
0.91	21.921	16.382	38.893
0.92	22.604	16.838	40.291
0.93	23.354	17.339	41.829
0.94	24.192	17.898	43.546
0.95	25.148	18.535	45.506
0.96	26.270	19.282	47.808
0.97	27.651	20.201	50.640
0.98	29.485	21.420	54.406
0.99	32.377	23.340	60.343

## Anexo 5.2. Análisis Probit. Estimación TL<sub>50</sub>

### Probit Procedure

#### Iteration History for Parameter Estimates

Iter	Ridge	Loglikelihood	Intercept	tiempo
0	0	-1929.7218	0	0
1	0	-1405.5938	-1.404501142	0.0588851497
2	0	-1379.1727	-1.832285049	0.0787008173
3	0	-1378.8686	-1.884938258	0.0811522638
4	0	-1378.8686	-1.885689845	0.0811871527
5	0	-1378.8686	-1.885689845	0.0811871527

#### Model Information

Data Set	WORK.PROBITTIEMPOH066
Events Variable	muertos
Trials Variable	numero
Number of Observations	280
Number of Events	780
Number of Trials	2784
Name of Distribution	Normal
Log Likelihood	-1378.868575

#### Parameter Information

Parameter	Effect
Intercept	Intercept
tiempo	tiempo

#### Last Evaluation of the Negative of the Gradient

Intercept	tiempo
0.0000425627	0.0002266081

#### Last Evaluation of the Negative of the Hessian

	Intercept	tiempo
Intercept	1328.8581976	22588.927327
tiempo	22588.927327	454765.19425

Probit Procedure

Goodness-of-Fit Tests

Statistic	Value	DF	Pr > ChiSq
Pearson Chi-Square	316.6893	278	0.0550
L.R. Chi-Square	355.5404	278	0.0011

Response-Covariate Profile

Response Levels	2
Number of Covariate Values	280

All variances and covariances have been multiplied by the heterogeneity factor H= 1.1392.

Type III Analysis of Effects

Effect	DF	Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
tiempo	1	409.5499	<.0001

Analysis of Parameter Estimates

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	95% Confidence Limits	Chi- Square	Pr > ChiSq
Intercept	1	-1.8857	0.0742	-2.0311 -1.7402	645.60	<.0001
tiempo	1	0.0812	0.0040	0.0733 0.0891	409.55	<.0001

Probit Model in Terms of Tolerance Distribution

MU	SIGMA
23.2264562	12.3172197

Estimated Covariance Matrix  
for Tolerance Parameters

	MU	SIGMA
MU	0.224757	0.187298
SIGMA	0.187298	0.370441

---

Probit Procedure

Probit Analysis on tiempo

Probability	tiempo	95% Fiducial Limits	
0.01	-5.428	-7.957	-3.327
0.02	-2.070	-4.256	-0.248
0.03	0.060	-1.911	1.708
0.04	1.663	-0.150	3.183
0.05	2.966	1.281	4.384
0.06	4.076	2.497	5.408
0.07	5.049	3.561	6.308
0.08	5.920	4.513	7.115
0.09	6.712	5.377	7.850
0.10	7.441	6.171	8.529
0.15	10.460	9.438	11.358
0.20	12.860	12.000	13.641
0.25	14.919	14.157	15.641
0.30	16.767	16.051	17.479
0.35	18.480	17.767	19.223
0.40	20.106	19.360	20.911
0.45	21.679	20.875	22.572
0.50	23.226	22.346	24.226
0.55	24.774	23.804	25.893
0.60	26.347	25.274	27.599
0.65	27.973	26.785	29.370
0.70	29.686	28.371	31.242
0.75	31.534	30.077	33.269
0.80	33.593	31.973	35.530
0.85	35.992	34.177	38.171
0.90	39.012	36.946	41.498
0.91	39.741	37.614	42.303
0.92	40.533	38.339	43.177
0.93	41.404	39.137	44.138
0.94	42.377	40.027	45.212
0.95	43.486	41.042	46.437
0.96	44.790	42.235	47.876
0.97	46.393	43.700	49.647
0.98	48.523	45.647	52.001
0.99	51.881	48.715	55.713



## Anexo 6. Análisis Probit. Estimación CL<sub>50</sub> y TL<sub>50</sub> aislamiento A778 de *M. anisopliae*

### Anexo 6.1. Análisis Probit. Estimación CL<sub>50</sub>

#### Probit Procedure

##### Iteration History for Parameter Estimates

Iter	Ridge	Loglikelihood	Intercept	concentracion
0	0	-390.24186	0	0
1	0	-306.82375	-1.472159774	0.2165049788
2	0	-302.02086	-1.944170874	0.2831508591
3	0	-301.95902	-2.005914896	0.2917705461
4	0	-301.95901	-2.006770501	0.2918897306
5	0	-301.95901	-2.006770501	0.2918897306

#### Model Information

Data Set	WORK.PROBIT778
Events Variable	muertos
Trials Variable	numero
Number of Observations	57
Number of Events	237
Number of Trials	563
Name of Distribution	Normal
Log Likelihood	-301.9590061

##### Parameter Information

Parameter	Effect
Intercept	Intercept
concentracion	concentracion

##### Last Evaluation of the Negative of the Gradient

Intercept	concentracion
4.8348832E-6	-8.021804E-7

##### Last Evaluation of the Negative of the Hessian

	Intercept	concentracion
Intercept	289.57060402	1860.4203255
concentracion	1860.4203255	13400.058084

#### Probit Procedure

##### Goodness-of-Fit Tests

Statistic	Value	DF	Pr > ChiSq
Pearson Chi-Square	352.0871	55	<.0001
L.R. Chi-Square	245.2368	55	<.0001

##### Response-Covariate Profile

Response Levels	2
Number of Covariate Values	57

All variances and covariances have been multiplied by the heterogeneity factor H= 6.4016.

Type III Analysis of Effects

Effect	DF	Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
concentracion	1	19.2625	<.0001

Analysis of Parameter Estimates

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	95% Confidence Limits	Chi- Square	Pr > ChiSq
Intercept	1	-2.0068	0.4524	-2.8935 -1.1200	19.68	<.0001
concentracion	1	0.2919	0.0665	0.1615 0.4222	19.26	<.0001

Probit Model in Terms of Tolerance Distribution

MU SIGMA  
6.87509799 3.42595129  
Estimated Covariance Matrix  
for Tolerance Parameters

	MU	SIGMA
MU	0.270004	0.080096
SIGMA	0.080096	0.609326

Probit Procedure

Probit Analysis on concentracion

Probability	concentr...	95% Fiducial Limits
0.01	-1.0949	-7.5629 1.4116
0.02	-0.1609	-5.8645 2.0730
0.03	0.4316	-4.7900 2.4957
0.04	0.8773	-3.9838 2.8158
0.05	1.2399	-3.3295 3.0778
0.06	1.5485	-2.7741 3.3021
0.07	1.8191	-2.2883 3.5001
0.08	2.0614	-1.8544 3.6784
0.09	2.2817	-1.4609 3.8416
0.10	2.4846	-1.0996 3.9929
0.15	3.3243	0.3826 4.6327
0.20	3.9917	1.5379 5.1638
0.25	4.5643	2.5031 5.6454
0.30	5.0785	3.3383 6.1095
0.35	5.5550	4.0736 6.5782
0.40	6.0071	4.7247 7.0696
0.45	6.4446	5.3023 7.5973
0.50	6.8751	5.8172 8.1702
0.55	7.3056	6.2827 8.7926
0.60	7.7431	6.7137 9.4669
0.65	8.1952	7.1254 10.1977
0.70	8.6717	7.5324 10.9947
0.75	9.1859	7.9501 11.8763
0.80	9.7585	8.3971 12.8761
0.85	10.4259	8.9021 14.0575
0.90	11.2656	9.5216 15.5600
0.91	11.4685	9.6693 15.9248
0.92	11.6888	9.8291 16.3218
0.93	11.9311	10.0041 16.7590
0.94	12.2017	10.1987 17.2481
0.95	12.5103	10.4199 17.8068
0.96	12.8729	10.6786 18.4643
0.97	13.3186	10.9953 19.2738
0.98	13.9111	11.4145 20.3519
0.99	14.8451	12.0718 22.0545

## Anexo 6.2. Análisis Probit. Estimación TL<sub>50</sub>

### Probit Procedure

#### Iteration History for Parameter Estimates

Iter	Ridge	Loglikelihood	Intercept	tiempo
0	0	-630.76393	0	0
1	0	-283.60025	-0.405713265	0.2179599801
2	0	-203.69606	-0.894289875	0.4008380672
3	0	-161.70784	-1.49233225	0.6312389626
4	0	-139.67062	-2.154645394	0.9145246052
5	0	-133.29329	-2.666609372	1.1516837441
6	0	-132.73503	-2.866498419	1.2467615583
7	0	-132.73027	-2.887303371	1.2566310991
8	0	-132.73027	-2.88749223	1.2567199946
9	0	-132.73027	-2.88749223	1.2567199946

#### Model Information

Data Set	WORK.PROBITTIEMPO778
Events Variable	muertos
Trials Variable	numero
Number of Observations	91
Number of Events	739
Number of Trials	910
Name of Distribution	Normal
Log Likelihood	-132.7302743

#### Parameter Information

Parameter	Effect
Intercept	Intercept
tiempo	tiempo

#### Last Evaluation of the Negative of the Gradient

Intercept	tiempo
-1.676043E-7	-1.019192E-6

#### Last Evaluation of the Negative of the Hessian

	Intercept	tiempo
Intercept	131.21568303	303.95332929
tiempo	303.95332929	793.71512792

#### Goodness-of-Fit Tests

Statistic	Value	DF	Pr > ChiSq
Pearson Chi-Square	38.4863	89	1.0000
L.R. Chi-Square	40.5263	89	1.0000

---

Response-Covariate Profile  
 Response Levels 2  
 Number of Covariate Values 91

Since the chi-square is small ( $p > 0.1000$ ), fiducial limits will be calculated using a t value of 1.96.

Type III Analysis of Effects

Effect	DF	Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
tiempo	1	141.5493	<.0001

Analysis of Parameter Estimates

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	95% Confidence Limits	Chi- Square	Pr > ChiSq
Intercept	1	-2.8875	0.2598	-3.3967 -2.3783	123.54	<.0001
tiempo	1	1.2567	0.1056	1.0497 1.4637	141.55	<.0001

Probit Model in Terms of Tolerance Distribution

MU	SIGMA
2.29764167	0.7957222

Probit Procedure

Estimated Covariance Matrix  
for Tolerance Parameters

	MU	SIGMA
MU	0.004828	-0.000106
SIGMA	-0.000106	0.004473

---

Probit Procedure

Probit Analysis on tiempo

Probability	tiempo	95% Fiducial Limits	
0.01	0.4465	0.0489	0.7398
0.02	0.6634	0.3052	0.9294
0.03	0.8011	0.4674	1.0502
0.04	0.9046	0.5891	1.1413
0.05	0.9888	0.6879	1.2156
0.06	1.0605	0.7719	1.2790
0.07	1.1233	0.8454	1.3347
0.08	1.1796	0.9110	1.3848
0.09	1.2308	0.9706	1.4304
0.10	1.2779	1.0253	1.4725
0.15	1.4729	1.2508	1.6480
0.20	1.6279	1.4281	1.7894
0.25	1.7609	1.5784	1.9125
0.30	1.8804	1.7117	2.0247
0.35	1.9910	1.8333	2.1306
0.40	2.0960	1.9469	2.2329
0.45	2.1977	2.0548	2.3338
0.50	2.2976	2.1590	2.4352
0.55	2.3976	2.2612	2.5386
0.60	2.4992	2.3629	2.6458
0.65	2.6042	2.4659	2.7587
0.70	2.7149	2.5724	2.8797
0.75	2.8343	2.6853	3.0123
0.80	2.9673	2.8089	3.1621
0.85	3.1224	2.9507	3.3389
0.90	3.3174	3.1267	3.5639
0.91	3.3645	3.1689	3.6186
0.92	3.4157	3.2146	3.6781
0.93	3.4720	3.2647	3.7437
0.94	3.5348	3.3206	3.8170
0.95	3.6065	3.3841	3.9009
0.96	3.6907	3.4585	3.9996
0.97	3.7942	3.5497	4.1212
0.98	3.9319	3.6705	4.2833
0.99	4.1488	3.8603	4.5395